

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Alexander Berghaus

« ζ -Ketten Expression bei Patienten mit SCCHN»
Und
«Dendritische Zellen als Stimulatoren für T-Zellen in vitro»

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Daniel Müller
aus München
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. B. Wollenberg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. St. Endres
Prof. Dr. H.J. Kolb

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c.K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2004

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	3
EINLEITUNG	6
Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC)	6
Allgemeines	6
Therapiemöglichkeiten.....	6
Prognose	7
Die Humorale Immunantwort	9
Antigen präsentierende Zellen.....	15
Escape Mechanismen des Tumors	20
Fragestellung der Arbeit	23
MATERIAL UND METHODEN	25
Geräte	25
Verbrauchsmaterialien.....	26
Zellkulturmedien und Reagenzien	26
Zusätze von Zellkulturmedien.....	27
Seren.....	27
Zytokine	27
Chemikalien.....	27
Antikörper (Maus anti Human).....	28
Antikörper zur Charakterisierung von T-Lymphozyten.....	28
Antikörper zur Charakterisierung von dendritischen Zellen	28
Inhibierende Antikörper.....	29
Stimulierende Antikörper	29
Isotypkontrollen und sekundäre Antikörper.....	29

Zelllinien und Herkunft.....	29
Techniken	31
Zellkultur	31
Durchflußzytometrische Analysen	35
Bearbeitung der Tumor Proben sowie Zelltrennung	37
Gewinnung von Tumor-Poly-RNA	38
Transfektion von DCs mit DOTAp	38
Herstellung EBV-transformierter B-Zell- Linien (LCL)	39
Assays	39
Statistische Auswertung der beobachteten Ergebnisse.....	45
Berechnung der arithmetischen Mittelwerte.....	45
Berechnung der Standardabweichung	45
Evaluierung des Signifikanzniveaus und Berechnung der P-Werte.....	45
Angewendeter T-Test	45
ERGEBNISSE	46
ζ -Ketten Bestimmung bei HNO-Tumorpatienten	46
Einleitung.....	46
Verminderte Expression der ζ -Kette in T-Zellen des peripheren Blutes korreliert mit der Tumorgroße.....	47
Verminderte Expression der ζ -Kette auf T-Zellen des peripheren Blutes (PBMC) korreliert mit dem Stadium der Erkrankung (UICC)	49
Verminderte Expression der TCR ζ -Kette in Tumordinfiltrierenden Lymphozyten (TIL)	49
Verminderte Expression der ζ -Kette in T-Zellen des peripheren Blutes (PBMC) korreliert mit der Rezidivkrankung	51
Induktion tumorspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten unter Verwendung von Tumor-RNA-transfizierten dendritischen Zellen (DCs) als Stimulatoren.....	52
Dendritische Zellen	52
Testsysteme zur Überprüfung der Funktionalität von DCs	55
Untersuchung der Aufnahmekapazität von FITC-Dextran über den	

Mannoserezeptor.....	55
T-Zellstimulierung durch RNA-transfizierte dendritische Zellen im allogenen System	56
Statistische Bewertung der Ergebnisse	59
Phänotypische Analyse allogener T-Zellen.....	59
Lymphozytenstimulierung durch dendritische Zellen im Autologen System	60
Statistische Bewertung der Ergebnisse	61
Phänotypische Analyse Autologer T-Zellen.....	62
Nachweis der Tumorspezifität der generierten T-Zellen	63
Einführung in den chromfreisetzung Test	63
Ergebnisse des autogenen Chromfreisetzung Testes	66
DISKUSSION	71
ZUSAMMENFASSUNG	80
ζ-Ketten Expression bei Patienten mit SCCHN	80
Dendritische Zellen als Stimulatoren für T-Zellen in vitro	81
DANKSAGUNG	82
LITERATURVERZEICHNIS	83
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	91
LEBENS LAUF	95

EINLEITUNG

PLATTENEPITHELKARZINOME IM KOPF-HALS-BEREICH (HNSCC)

ALLGEMEINES

Mit einer Inzidenz von 80.000 Neuerkrankungen in den westlichen Industrienationen rangieren derzeit die Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches in der Tumorstatistik weltweit auf Platz 6 (Parker et al. 1996, Vokes et al. 1993). Plattenepithelkarzinome repräsentieren zirka 90% aller Malignome im Kopf-Hals-Bereich. Als Hauptrisikofaktoren werden übermäßiger Konsum von Nikotin und Alkohol angesehen. Selbst im Umfeld der zirka 3% der Patienten, bei welchen kein Genuß dieser Giftstoffe vorlag, findet sich ein hoher Nikotinkonsum im sozialen Umfeld (Tan et al. 1997). Das Manifestationsalter beträgt im Durchschnitt 60 +/- 15 Jahre. Dabei erkranken Männer derzeit noch häufiger als Frauen. Allerdings läßt sich über die letzten Jahre hinweg ein deutlicher Anstieg des Frauenanteils verzeichnen.

THERAPIEMÖGLICHKEITEN

In Abhängigkeit von Lokalisation und Ausdehnung des Befundes sollte primär die operative Resektion des Karzinoms angestrebt werden, welche postoperativ oftmals mit einer Radio- und / oder Chemotherapie kombiniert wird. Die Operationen erstrecken sich von Teilresektionen anatomischer Strukturen bis hin zu Totalresektionen, wie z. B. der Laryngektomie bei ausgedehntem Larynxbefall. Oft führen diese ausgedehnten Tumorresektionen zu verstümmelnden Operationen, die die Funktion des Sprechens und des Schluckaktes stark beeinträchtigen können. Bei Vorliegen von zervikalen Lymphknotenmetastasen schließt sich an die eigentliche Resektion des Primärtumors eine Ausräumung des regionären Lymphabflußgebietes im Rahmen einer Neck dissection an. Bei zusätzlich vorliegender Infiltration von Muskulatur, Haut oder Gefäßen werden diese Strukturen im Rahmen einer "radikalen" Neck dissection mitreseziert. Ziel des operativen Vorgehens ist stets eine vollständige Entfernung aller karzinomatös befallener Gewebeanteile, d.h. eine Resektion im Gesunden (R0-

Resektion). Diese bietet, unter kurativer, Zielsetzung die besten Voraussetzungen für eine sich postoperativ anschließende adjuvante Therapie.

Ein die Überlebenszeit verlängernder Effekt einer initialen Chemotherapie ist allerdings bislang in keiner Studie gesichert worden (Catimel 1996, Ervin et al. 1987, Stell et al. 1990).

Primäre Radiochemotherapien sind nur bei sehr ausgedehnten, inoperablen Tumoren indiziert. Auch ältere Patienten, denen die ausgedehnten operativen Maßnahmen mit einer sich anschließenden komplizierten Rehabilitation von Sprache und Schluckakt erspart werden sollen, werden oft dieser Art von Therapie zugeführt. Häufige Nebenwirkungen und Komplikationen einer Radiatio sind Knochennekrosen, Gewebnekrosen, Atrophien, persistierende Lymphödeme, Xerostomie, Ageusie und die sogenannte Sicca-Symptomatik (Ervin et al. 1987, Hodder et al. 1997).

PROGNOSE

Fortgeschrittene Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich haben insgesamt eine schlechte Prognose. Dabei ist diese, neben dem Ausmaß des Primärtumors, abhängig von Faktoren wie:

(a) der anatomischen Lokalisation

Die beste Prognose besteht bei Karzinomen der Glottis. Der Grund hierfür ist die frühe klinische Symptomatik der persistierenden Heiserkeit und der spärliche Lymphabfluß mit konsekutiv niedriger Metastasierungstendenz. Bei Hypopharynxkarzinomen ist die Prognose am schlechtesten (Grau et al. 1997). Zweitkarzinome treten bei zirka 15% bis 30% der Patienten aufgrund der Feldkanzerisierung des oberen Schluck-/Atemweges auf. Ein Drittkarzinom tritt in 1% der Fälle auf (Dooghe und Albers 1994, Grau et al. 1997).

(b) der Resektion im Gesunden (R0)

Die vollständige Resektion des Karzinoms eröffnet dem Patienten die größte Wahrscheinlichkeit auf ein rezidivfreies Überleben.

(c) dem Vorhandensein von lokoregionären Lymphknotenmetastasen

Es besteht ein erhöhtes Risiko für Patienten, bei welchen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits regionäre Lymphknotenmetastasen vorlagen, nach

Abschluß der Primärtherapie an einem Rezidiv zu erkranken (Berlinger et al. 1976). Bei regionären Lymphknotenmetastasen sind kapselüberschreitendes Wachstum, Anzahl der betroffenen Knoten und Lokalisation der Lymphknoten für die Prognose maßgeblich entscheidend (Houck und Medina 1995, Leemans et al. 1993).

(d) dem Bestehen von Fernmetastasen

Klinisch nachweisbare Fernmetastasen liegen in 15% bis 25% bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vor. Autopsieprotokolle berichten in zirka 40% der Fälle von der Existenz von Fernmetastasen, so daß die tatsächliche Inzidenz wahrscheinlich höher ist (Zbaren und Lehmann 1987).

(e) dem Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen im peripheren Blut und Knochenmark

Die systemische Dissemination läßt sich durch den Nachweis ausgeschwemmter Tumorzellen im peripheren Blut und Knochenmark belegen (Chaubal et al. 1998, Van Dongen et al. 1996, Wollenberg et al. 1994).

Die aktuelle Standardtherapie der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich ermöglicht bei fortgeschrittenen Tumorstadien (Stadium III und IV) eine 2-Jahresüberlebensrate von nur 30% (Vokes et al. 1993). Ein loko-regionäres Rezidiv tritt in ca. 30% der Fälle auf. Diese nehmen meist ihren Ursprung aus den Randbereichen des ehemaligen Primärtumors. Fernmetastasen bilden sich in ca. 15% der Fälle (Vokes et al. 1993).

Nach Abschluß der Primärtherapie erfolgt eine engmaschige Nachsorge der operierten Patienten. Dabei werden vorrangig klinische Untersuchung, endoskopische und radiologische Verfahren angewendet. Der Einsatz von Tumormarkern vereinfacht und erweitert dabei die Nachsorgemöglichkeiten.

DAS IMMUNSYSTEM

Das Immunsystem ist beim gesunden Menschen in der Lage, entartete Zellen zu erkennen und zu bekämpfen. Eine erhebliche und dauerhafte Schwächung des Immunsystems kann für das Entstehen von malignen Erkrankungen verantwortlich gemacht werden. Daher ist eine grundlegende Kenntnis der Funktion des Immunsystems die Voraussetzung für das Verständnis der Entstehung von Malignomen. Im Folgenden werden nun die Humorale und T-Zell vermittelte Immunantwort in Grundzügen skizziert, um schließlich auf die Antigen präsentierenden Zellen einzugehen.

DIE HUMORALE IMMUNANTWORT

Viele der für den Menschen infektiösen Bakterien vermehren sich in den extrazellulären Bereich des Körpers, und die meisten intrazellulären Krankheitserreger verbreiten sich von Zelle zu Zelle, indem sie sich durch die extrazellulären Flüssigkeiten bewegen. Die Hauptfunktion der humoralen Immunantwort ist es, die extrazellulären Mikroorganismen zu zerstören und die Verbreitung intrazellulärer Infektionen zu verhindern. Dies wird durch Antikörper erreicht, die von B-Lymphozyten sezerniert werden. Die B-Zell-Aktivierung durch die meisten Antigene, besonders durch monomere Proteine, erfordert die Bindung des Antigens durch die B-Zell-Oberflächen-Immunglobuline und eine Wechselwirkung der B-Zelle mit antigenspezifischen T-Helferzellen, die im nächsten Kapitel beschrieben werden. Diese induzieren eine Phase starker B-Zell-Proliferation. Anschließend differenzieren die klonal expandierten Nachkommen der naiven B-Zellen zu antikörpersezernierenden Zellen oder zu B-Gedächtniszellen. Während der Differenzierung der aktivierten B-Zellen können verschiedene Veränderungen im Antikörpermolekül auftreten. So ist eine Änderung des Antikörperisotypes möglich. Ebenso werden die antigenbindenden Eigenschaften des Antikörpers, durch somatische Hypermutation in den Genen der variablen Region, beeinflusst. Das kann zu einem Verlust der Antigenbindung und zum Tod der B-Zelle führen, oder zu einer erhöhten Affinität des Antikörpers für dieses bestimmte Antigen und damit zur selektiven Expansion. Die somatischen Hypermutationen und die Selektion in Folge einer hochaffinen Bindung erfolgen in Keimzentren, die von den proliferierenden B-Zellen in den

Lymphfollikeln gebildet werden, wo das Antigen auf follikulären dendritischen Zellen präsentiert wird. T-Helferzellen kontrollieren diese Prozesse, indem sie (i,) selektiv die Zellen aktivieren, die antigene Peptide vorzeigen, (ii,) Zytokine abgeben, die einen Klassenwechsel bewirken, und (iii,) die Proliferation und anschließenden Differenzierung zu Plasmazellen und B-Gedächtniszellen induzieren. Einige nicht-Protein-Antigene stimulieren B-Zellen auch ohne spezifische T-Helferzellen. Diese T-unabhängigen Antigene bewirken weder einen Isotypenwechsel, noch die Bildung von B-Gedächtniszellen. Sie spielen aber eine wichtige Rolle bei der Verteidigung gegen Erreger, deren Oberflächenantigene keine T-Zell-Antwort herbeiführen können.

Die Antikörperantwort, die mit einer Bindung des Antigens an IgM-exprimierende B-Zellen beginnt, kann zur Produktion von Antikörpern mit derselben Spezifität und allen verschiedenen Isotypen führen. Jeder Isotyp ist sowohl im Hinblick auf die Stelle, an der er im Körper wirken kann, spezialisiert als auch in Bezug auf seine Funktion. IgM-Antikörper werden in den Anfangsstadien der Immunantwort synthetisiert und hauptsächlich im Blut gefunden. Sie haben die Struktur von Pentameren und sind darauf spezialisiert, durch die Bindung an das Antigen das Komplementsystem zu aktivieren. IgG-Antikörper werden erst im späteren Verlauf gebildet, zeigen im Allgemeinen eine höhere Affinität, und kommen im Blut und in der extrazellulären Flüssigkeit vor, wo sie Toxine, Viren und Bakterien neutralisieren, sie für die Phagozytose opsonisieren und das Komplementsystem aktivieren können. IgA-Antikörper werden als Monomere synthetisiert, die im Blut und in extrazellulären Flüssigkeiten zu finden sind, oder sie werden in der Lamina propria als dimere Moleküle gebildet, die selektiv über Epithelien in Bereiche, wie das Darmlumen, transportiert werden, wo sie Toxine und Viren neutralisieren und den Eintritt von Bakterien durch das intestinale Epithel blockieren. Die meisten IgE-Antikörper sind an die Oberfläche von Mastzellen gebunden, die sich vor allem direkt unterhalb der Körperoberfläche befinden. Die Antigenbindung an diese IgE-Ak ist eine lokale Verteidigungsreaktionen. Jeder Isotyp besetzt also eine bestimmte Stelle im Körper und spielt eine spezifische Rolle bei der Abwehr des Körpers gegen extrazelluläre Pathogene und ihre toxischen Produkte.

Die mit Antikörpern besetzten Krankheitserreger werden auf der Oberfläche verschiedener Zellen von Fc-Rezeptoren erkannt, die an die Domänen der

konstanten Region der gebundenen Antikörper binden und die Zerstörung des Pathogens auslösen. Fc-Rezeptoren bilden eine Familie von Molekülen, von denen jedes ein Immunglobulin eines bestimmten Isotyps erkennt. Fc-Rezeptoren auf Makrophagen und Neutrophilen erkennen die konstanten Regionen der IgG-Antikörper, die an die Oberfläche eines Pathogens gebunden sind und lösen die Aufnahme und die Zerstörung von mit IgG-beschichteten Bakterien durch diese phagozytischen Zellen aus. Die Bindung des Fc-Rezeptors induziert darüber hinaus, in den intrazellulären Vesikeln der Phagocyten, die Bildung antimikrobieller Agentien. Eosinophile sind wichtig für die Eliminierung von Parasiten, die zu groß sind, um aufgenommen zu werden. Sie tragen sowohl Fc-Rezeptoren, die für die konstanten Region von IgG spezifisch sind, als auch hochaffine Rezeptoren für IgE. Eine Anhäufung dieser Rezeptoren löst die Freisetzung toxischer Substanzen auf die Oberfläche des Parasiten aus. Auch natürliche Killerzellen und Mastzellen setzen den Inhalt ihrer Granula frei, wenn ihre Fc-Rezeptoren besetzt worden sind. Mastzellen wirken außerdem als akzessorische Zellen einer humoralen Immunantwort. Sie exprimieren den hochaffinen Rezeptor für IgE allerdings kontinuierlich. Im Gegensatz zu anderen Fc-Rezeptoren kann dieser Rezeptor frei monomere Antikörper binden und so Pathogene direkt dort bekämpfen, wo sie in das Gewebe eindringen. Wenn das IgE auf der Oberfläche einer Mastzelle durch die Bindung von Antigenen aggregiert wird, löst es in den Mastzellen die Freisetzung von Histamin aus, das den Blutfluss zu Stellen der Infektion ansteigen lässt und Antikörper als auch Effektorzellen dorthin lockt. Mastzellen befinden sich meist unter epithelialen Oberflächen der Haut, des Verdauungstraktes und der Atemwege. Ihre Aktivierung durch harmlose Substanzen ist verantwortlich für viele Symptome akuter allergischer Reaktionen.

Ein weiter Teil der humoralen Immunantwort ist das Komplement, ein System von Plasmaproteinen, die mit gebundenen Antikörpern und Oberflächenrezeptoren interagieren, um bei der Beseitigung von Krankheitserregern zu helfen. Es stellt einen der wichtigsten Mechanismen dar, durch die eine Antigenerkennung in eine wirkungsvolle Verteidigung gegen Infektionen umgesetzt wird. Seine Bedeutung liegt besonders im Schutz vor extrazellulären Bakterien.

Der entscheidende erste Schritt der adaptiven Immunantwort ist die Aktivierung naiver antigenspezifischer T-Zellen, durch professionelle antigenpräsentierende Zellen. Das besondere Merkmal der professionellen antigenpräsentierenden Zellen ist die Expression kostimulierender Faktoren, von denen B7.1 und B7.2 am besten charakterisiert sind. Naive T-Zellen antworten auf ein Antigen nur, wenn die gleiche Zelle dem T-Zell-Rezeptor das spezifische Antigen und gleichzeitig CD28 das B7 Molekül präsentiert. CD28 befindet sich auf der T-Zelle und ist der Ligand von B7. Die Arten und Funktionen der antigenpräsentierenden Zellen werden im nächsten Abschnitt genauer erklärt. Die Aktivierung von T-Zellen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen führt zu ihrer Proliferation und zur Differenzierung ihrer Nachkommen zu bewaffneten Effektorzellen. Diese Vorgänge sind von der Produktion von Zytokinen wie dem T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 und dessen Bindung an einen hochaffinen Rezeptor auf der aktivierten T-Zelle abhängig. T-Zellen, deren Rezeptoren ihre Liganden ohne gleichzeitige kostimulation Signale binden, produzieren kein IL-2. Sie werden statt dessen anergisch. Diese beiden Vorbedingungen, Rezeptorbindung und Kostimulation, sorgen dafür, daß naive T-Zellen nicht auf die Antigene des eigenen Gewebes reagieren das keinen kostimulierenden Faktor aufweist. Proliferierende T-Zellen entwickeln sich zu bewaffneten T-Effektorzellen, das entscheidende der meisten adaptiven Immunantworten. Wenn ein expandierter Klon von T-Zellen einmal die Effektorfunktion erreicht hat, können seine Nachkommen auf jede Zielzelle reagieren, die Antigene an ihrer Oberfläche trägt. T-Effektorzellen können eine Vielzahl von Funktionen ausüben. Die wichtigsten sind das Töten infizierter Zellen durch zytotoxische CD8-T-Zellen und die Aktivierung von Makrophagen durch T_H 1-Zellen (zellvermittelte Immunität) sowie die Aktivierung von B-Zellen, durch sowohl T_H 1-Zellen als auch T_H 2-Zellen, damit diese für die humorale Immunantwort verschiedene Typen von Antikörpern bilden können.

Wechselwirkungen zwischen T-Effektorzellen und ihren Angriffszielen beginnen mit einem vorübergehenden unspezifischen Kontakt zwischen den Zellen. Die T-Zell-Effektorfunktion wird nur ausgelöst, wenn der Rezeptor der T-Effektorzelle auf der Oberfläche der Zielzelle Peptid:MHC-Komplexe erkennt. Danach binden die T-Effektorzellen fester an die antigentragenden Zielzellen, was zu ihrer Aktivierung

oder zu ihrem Tod führt. Welche Folgen die Antigenerkennung durch eine T-Effektorzelle hat, hängt vor allem von den Molekülen ab, die sie nach der Bindung an die Zielzelle synthetisiert. CD8-Killerzellen speichern in speziellen lytischen Granula fertige Zytotoxine, die genau an der Stelle freigesetzt werden können, die mit der infizierten Zielzelle in Kontakt steht. Zytokine sowie eines oder mehrere Mitglieder der TNF-Familie der membranassoziierten Effektorproteine werden von allen drei Typen von T-Effektorzellen de novo synthetisiert. T_H 2-Zellen exprimieren B-Zell-aktivierende Effektormoleküle, T_H 1-Zellen dagegen Effektormoleküle, die Makrophagen aktivieren. CD8 T-Zellen exprimieren ein membranassoziiertes Protein, das den programmierten Zelltod auslöst; darüber hinaus setzen sie IFN- γ frei. Die membranassoziierten Effektormoleküle können nur an eine Zelle Signale senden, mit der eine Wechselwirkung besteht, wohingegen lösliche Zytokine mit Zytokinrezeptoren reagieren, die lokal auf der Zielzelle oder über eine Entfernung auf hämatopoetische Zellen exprimiert werden. Auf der Wirkung von Zytokinen und membrangebundenen Effektormolekülen über Zytokinrezeptoren beruhen die Effektorfunktionen der T-Zelle.

Zytotoxische CD8-T-Effektorzellen spielen eine wesentliche Rolle bei der Verteidigung des Wirtes gegen Pathogene, die im Zytosol leben, meist also Viren. Diese zytotoxischen T-Zellen können jede Zelle abtöten, die so ein Pathogen in sich trägt. Sie erkennen dabei fremde Peptide, die, gebunden an MHC-Klasse-I-Moleküle, an die Zelloberfläche transportiert werden. Zytotoxische CD8-T-Zellen wirken durch die Freisetzung von zwei Klassen vorgeformter Zytotoxine. Die Granzyme scheinen den programmierten Zelltod in jeder Zielzelle zu induzieren. Das porenbildende Protein Perforin bohrt Löcher in die Zielzellmembran, durch die Granzyme in die Zelle gelangen können. Auch der membrangebundene Fas-Ligand, der auf CD8- und einigen CD4-T-Zellen exprimiert wird, kann eine Apoptose induzieren, indem er auf den Zielzellen an Fas bindet. Diese Eigenschaften erlauben es der zytotoxischen T-Zelle, praktisch jede Zelle, deren Zytosol mit einem Krankheitserreger infiziert ist, anzugreifen und zu vernichten. Zytotoxische CD8-T-Zellen produzieren auch INF- α , das die virale Replikation hemmt und große Bedeutung für die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und für die Makrophagenaktivierung hat. Zytotoxische T-Zellen vernichten

infizierte Zielzellen mit großer Präzision und verschonen benachbarte normale Zellen. Dies erlaubt die Vernichtung befallener Zellen bei gleichzeitiger Minimalisierung der Gewebeschädigung.

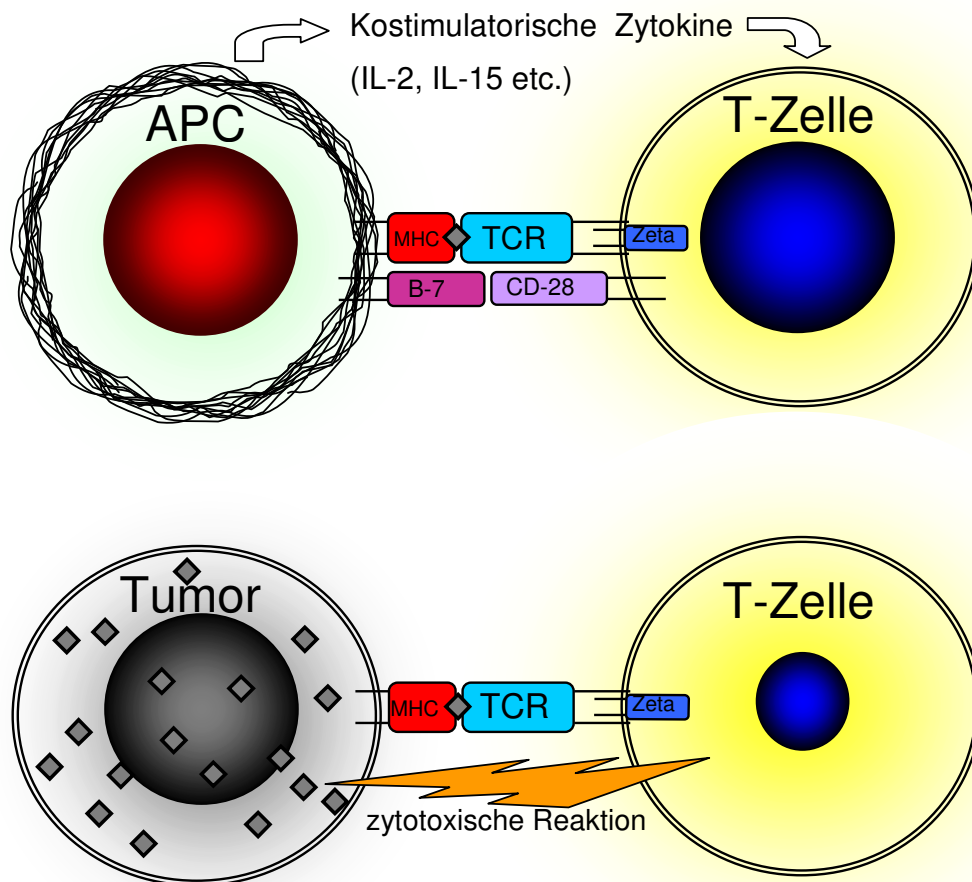


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Funktion, der T-Zell spezifischen Immunantwort. Die Antigenpräsentierende Zelle präsentiert über MHC ein tumorspezifisches Peptid. Dieses wird vom T-Zellrezeptor erkannt. Durch das Vorhandensein der kostimulatorischen Moleküle reift die T-Zelle zu einer zytotoxischen T-Zelle heran. Beim zweiten Kontakt mit dem tumorspezifischen Antigen erfolgt eine zytotoxische Reaktion und die Tumorzelle wird zerstört. Intrazellulär in der T-Zelle liegt die ζ -Kette (hier Zeta), die die Aufgabe der Signaltransduktion erfüllt.

CD4-T-Zellen können Makrophagen aktivieren und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Abwehr solcher intrazellulären und eingekapselten extrazellulären Pathogene, die den Tötungsversuchen nicht aktivierter Makrophagen widerstehen. Die Makrophagenaktivierung erfolgt durch membrangebundenen Signale aktivierter T_H 1-Zellen und durch das stark makrophagenaktivierende

Zytokin IFN- γ , das von diesen Zellen sezerniert wird. Einmal aktiviert, können die Makrophagen intrazelluläre und aufgenommene Bakterien abtöten. Sie können außerdem eine lokale Gewebeschädigung hervorrufen. Daher müssen T-Zellen die Aktivität der Makrophagen streng regulieren. T_H 1-Zellen bilden verschiedene Zytokine und Oberflächenmoleküle, die nicht nur infizierte Makrophagen aktivieren können, sondern auch chronisch infizierte alternde Makrophagen töten, Knochenmark zur Bildung neuer Makrophagen anregen und frische Makrophagen an den Ort der Infektion locken. Die T_H 1-Zellen spielen also eine zentrale Rolle bei der Kontrolle und Koordinierung der Wirtsabwehr gegen intrazelluläre Pathogene. Wahrscheinlich erklärt das Fehlen dieser Funktion das Vorherrschen intrazellulärer Infektionen bei erwachsenen AIDS-Patienten.

ANTIGEN PRÄSENTIERENDE ZELLEN

Obwohl alle Zellen des Körpers die Kapazität aufweisen, Antigene auf ihren Oberflächen zu exprimieren, ist nur eine gewisse Gruppe von hämatopoetischen Zellen in der Lage als „professionelle“ APCs zu fungieren, um effektiv T-Lymphozyten zu aktivieren und eine Immunantwort zu induzieren. Zu diesen Zelltypen gehören Makrophagen, aktivierte B-Lymphozyten und die dendritischen Zellen (DC), die sich in Langerhans'sche Zellen, interstitielle DCs und lymphoide bzw. plasmazytäre DCs unterteilen lassen. Die dendritischen Zellen sind die potentesten APCs die bekannt sind und entwickeln sich ebenfalls aus CD34⁺ myeloischen Vorläuferzellen des Knochenmarks. Im peripheren Blut beträgt der Anteil an DCs ca. 0,1 – 0,5 % aller Leukozyten (Fearnley *et al.* 1997) und deshalb wurde die Rolle der DCs in immunologischen Prozessen erst relativ spät erkannt. Nach ihrer Migration aus dem Knochenmark differenzieren sie sich im peripheren Blut zu unreifen DCs und wandern in die angrenzenden Organe, wo sie Antigene aufnehmen. Im Zuge der Antigenaufnahme erfolgt die Aktivierung und Reifung der DCs und folglich die Migration durch die afferenten Lymphgefäße in die T-Zell reichen Regionen der sekundären lymphatischen Organe. Diese Prozesse werden im wesentlichen durch das Zusammenspiel von Chemokinen und Zytokinen und deren Rezeptoren auf den DCs gesteuert. Aufgrund des Fehlens von spezifischen Oberflächenmarkern, die eindeutig unreife DC Vorläuferzellen charakterisieren, ist die Unterscheidung der beiden myeloischen Subpopulationen

noch immer nicht komplett definiert. Ein Unterschied besteht darin, daß sie in unterschiedlichen Geweben des Körpers vorkommen. Die Langerhans'schen Zellen befinden sich vornehmlich in der Haut, während die interstitiellen DCs in allen Organen vorkommen, um dort Antigene aufzunehmen. Beide Populationen dirigieren CD-4⁺ T-Lymphozyten vornehmlich in Richtung sogenannter T-Helfer 1 (TH1)- Antworten (Arpinati *et al.* 2000, Cella *et al.* 1996). Die dritte Population, die lymphoiden oder plasmazytären (CD123⁺ und CD8⁺) DCs kommen im Blut und in den Tonsillen vor und zeigen eine starke Abhängigkeit von dem Zytokin Interleukin-3 (Banchereau *et al.* 2000, Galibert *et al.* 2001). Sie dirigieren CD-4⁺ T-Zellen in Richtung T-Helfer 2 (TH2)- Aktivität und werden daher auch als DC2 (Arpinati *et al.* 2000) bezeichnet. Damit ist ihre Rolle stark mit dem humoralen Arm der adaptiven Immunität verknüpft.

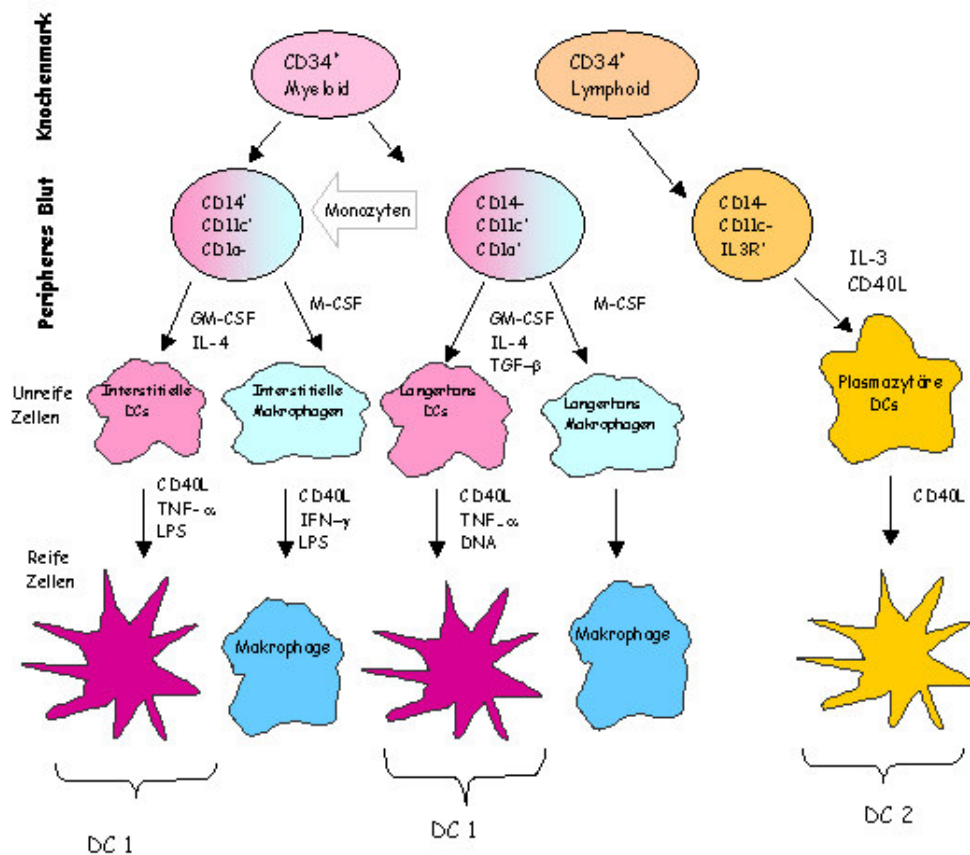


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Differenzierung verschiedener Subpopulationen von dendritischen Zellen, aus einer CD34⁺ Vorläuferzelle, in Abhängigkeit des umgebenden Zytokin-Mikro-Milieus (nach Banchereau *et al.* 2000).

DCs spielen eine zentrale Rolle bei der Antigenpräsentation. Hochaffine antigenbindende Rezeptoren, wie der Mannoserezeptor und die Fc γ und Fc ϵ -Rezeptoren erlauben eine Antigenaufnahme von hoher Effizienz, so daß es der Zelle gestattet, Antigen sogar im pico- sowie nanomolaren Bereich zu präsentieren, während andere APCs erst bei einer Antigenkonzentration im mikromolaren Bereich eine effiziente Antigenpräsentation leisten können.

DCs sind die einzigen APCs, die in der Lage sind primäre Immunantworten hervorzurufen und sogar naive CD-8⁺ zytotoxische T-Zellen zu stimulieren (Bell *et al.* 1999, Banchereau *et al.* 1998). *In vitro* Studien haben deutlich demonstrieren können, daß DCs in der Lage waren hoch effizient antigenspezifische CTL-Antworten hervorzurufen. Hierzu wurden sie entweder (i,) genetisch modifiziert (Brossart *et al.* 1997, Song *et al.* 1997), (ii,) mit Peptiden oder mit Tumorantigenen (Ashley *et al.* 1997, Boczkowski *et al.* 1998, Nair *et al.* 1998) beladen oder (iii,) mit tumorspezifischer RNA (Nair *et al.* 1998, Su *et al.* 2001) beladen um spezifische Antigene zu exprimieren.

Experimentelle Ergebnisse von Studien an Tiermodellen (Zitvogel *et al.* 1996), sowie erste klinische Studien (Nestle *et al.* 1998, Murphy *et al.* 1996, Tjoa *et al.* 1998, Hsu *et al.* 1996) unterstützen die Hypothese, das Individuen, die mit Tumorpeptid-beladenen DCs vakziniert wurden, eine tumorspezifische humorale und zelluläre Antwort hervorrufen konnten. Dies führte zum Rückgang der Tumorlast und dem Aufbau einer schützenden Immunität gegenüber neuem Tumorwachstum *in vivo*. DCs zirkulieren im peripheren Blut und sind aufgrund ihrer hohen Mobilität in sämtlichen Geweben des Körpers zu finden. Da sie in nur geringen Mengen im peripheren Blut vorhanden sind, kann eine direkte Manipulation dieser Zellen *in vitro* nicht vorgenommen werden, doch haben sich mittlerweile Methoden etabliert, die ein relativ einfaches Anreichern dieser Zellen aus dem peripheren Blut ermöglicht. Durch die Kombination von GM-CSF und Interleukin-4 (IL-4) lassen sich ausreichende Mengen an unreifen DCs aus monozytären Vorläuferzellen des peripheren Blutes differenzieren, deren weitere Entwicklung zu reifen DCs durch Kombination mit TNF- α , GM-CSF und IL-1 β erreicht werden kann. Morphologisch sind DCs charakterisiert als bizarr aussehende, unregelmäßig geformte Zellen mit großen Zellkörpern und langen zytoplasmatischen Ausläufern (Dendriten), die sich wie feine Schleierfäden vom

Zellkörper abheben. Im unreifen Zustand zeigen DCs deutlich verkürzte Fortsätze (Dendriten), doch im ausgereiften Stadium werden die zytoplasmatischen Ausläufer länger und nehmen dadurch die eher charakteristische Struktur an.

Die Antigenaufnahme erfolgt normalerweise in der Peripherie und veranlasst dann die DCs zu den sekundären lymphoiden Organen zu wandern, wo sie das Antigen den T-Zellen präsentieren.

Folgende Mechanismen der Antigenaufnahme sind charakteristisch für DCs:

- Makropinozytose: Rezeptor vermittelnde Endozytose über den Mannoserezeptor: Der Mannoserezeptor entläßt seinen Ligand bei saurem PH in endosomale Kompartimente und wird dann wieder zurückgewonnen.
- Rezeptor vermittelnde Endozytose über FcRII- Rezeptoren. Damit ist die DC u.a. in der Lage Antikörper-Antigenkomplexe zu binden und aufzunehmen.
- Phagozytotische Aufnahme von apoptotischen (Albert *et al.* 1998) und nekrotischen Zellfragmenten (Galucci *et al.* 1999), sowie ganzen Zellen über CD36 und $\alpha v \beta 3$ und $\alpha v \beta 5$ Integrine.
- Aufnahme von Viren, Bakterien (auch Mykobakterien) und intrazelluläre Parasiten, wie *Leishmania major*.
- Aufnahme von Peptidgeladenen Hitzeschockproteine gp96 und Hsp 70 (Bell 1998).

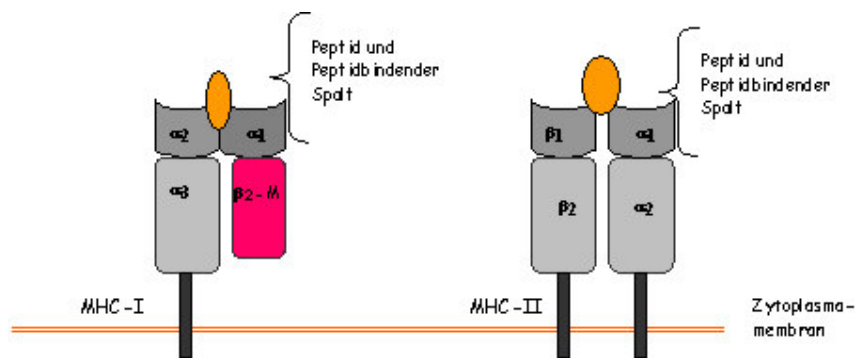


Abbildung 3. MHC-Klasse I-Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten, eine α - oder schwere Kette, die im MHC-kodiert wird und eine kleinere, nicht kovalent angelagerte Kette, (β_2 -Mikroglobulin (β_2 -M)), die nicht im MHC kodiert wird. Nur die α -Kette ist fest in der Zellmembran verankert und besteht aus drei Domänen. Die Struktur der α_1 und α_2 Domänen bilden ein Paar und schaffen an der Oberfläche des Moleküls den Peptidbindenden Spalt. MHC-Klasse II- Moleküle bestehen aus einem nichtkovalenten Komplex zweier α und β -Ketten, die beide die Membran durchdringen. Beide Ketten haben jeweils zwei Domänen, die gemeinsam den peptidbindenden Spalt bilden (nach Janeway 1997, verändert)

Wenn das antigene Protein in den endozytotischen Apparat der Zelle eintritt, wird es bei Makrophagen zunächst in lysosomale Vesikel geschleust, wo es in Peptidfragmente zerlegt wird, die daraufhin auf wenige MHC-Klasse-II-Moleküle geladen werden (Banchereau und Steinman 1998). Eine wichtige Rolle spielt hierbei der „Transporters associated with Antigen Processing-1“ und „-2“ kurz TAP. Die TAP-1 und TAP-2 Komplexe sind ATP-abhängige Transporter, die Peptide selektiv in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums bringen. Sie zeigen eine gewisse Spezifität für die Peptide die sie transportieren, so werden Peptide von acht oder mehr Aminosäuren mit hydrophoben oder basischen Aminosäureresten am Karboxylende bevorzugt transportiert. Diese Eigenschaft entspricht genau den Peptiden, die an MHC-I binden.

Weiterhin werden bei DCs große Mengen an MHC-Klasse-II-Moleküle produziert, die in zahlreichen spezialisierten MHC-Klasse-II-reichen Kompartimenten, den MIIC-Vesikeln auf ihre Beladung mit Peptidantigenen warten. Sie kommen nur in unreifen DCs vor und stellen späte endosomale Strukturen dar, die zusätzlich über die notwendige Ausrüstung an HLA-DM-Molekülen verfügen, die dabei helfen das Peptid auf die Bindungsfurche der MHC-II Moleküle zu laden. Der

Antigenaufnahme folgt dann die Reife der DCs und die MHC-Vesikel entlassen ihre Peptidbeladenen MHC-II-Komplexe an die Zelloberfläche. Diese Oberflächenkomplexe bleiben über mehrere Tage stabil. Darüber hinaus kommt es während der Reifung zur Hochregulierung der für die T-Zellaktivierung entscheidenden Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen, wie CD-54 (ICAM-1), CD-11a (LFA-1), CD-11c, CD-86 (B7-2) und CD-40, sowie zur Produktion von Interleukin-12 (IL-12). Dieses Zytokin hat eine positive immunstimulatorische Funktion und wirkt sowohl auf NK-Zellen, als auch auf B- und T-Zellen. So ausgerüstet erfüllen DCs alle Voraussetzungen um effektiv CD-4⁺ T-Zellen zu stimulieren. Sie sind allerdings auch in der Lage direkt zytotoxische CD-8⁺ T-Zellen zu stimulieren, die unmittelbar infizierte Zellen, Tumorzellen oder allogene Transplantate angreifen können. Dabei müssen DCs das Antigen über einen bisher ungeklärten Vorgang an den endosomalen Vesikeln vorbeischieben, um es über das Proteasom zu prozessieren und über die TAP-Transporter- MHC-I-Exportroute den CD-8⁺ T-Zellen zu präsentieren. Dabei können sie auch selbst von dem Virus infiziert werden (z.B. Influenza Virus) oder sie sind in der Lage Peptide von nicht replizierenden Mikroben oder sterbenden infizierten Zellen aufzunehmen und die Antigene über den MHC-I-Weg den CD-8⁺ T-Zellen präsentieren (Banchereau und Steinman 1998, Albert *et al.* 1998). Aufgrund der hohen Dichte an sowohl MHC-I, als auch MHC-II Molekülen und der Bereitstellung kostimulatorischer Signale ist eine einzige reife DC in der Lage 100 bis 3000 T-Zellen zu aktivieren (Banchereau und Steinman 1998, Bell *et al.* 1999).

ESCAPE MECHANISMEN DES TUMORS

In den vorhergehenden Seiten wurde in großen Zügen die Funktion des Immunsystems vorgestellt und die Aufgaben beschrieben, die von den antigenpräsentierenden Zellen erfüllt werden. Es ist immer wieder beeindruckend, welche verschiedenen Mechanismen dabei zum Einsatz kommen. Trotzdem gelingt es Tumorzellen dieser perfekt erscheinenden Abwehr zu entkommen. Welche Strategien und Mechanismen die Tumorzelle dazu anwendet soll nun kurz besprochen werden.

Tumoren können der Immunüberwachung auf verschiedenen Wegen entgehen. Grundsätzlich können drei Arten des Immunescapes unterschieden werden. Erstens können Tumoren eine nur geringe immunogene Wirkung haben. Einige Tumoren weisen keine Peptide neuartiger Proteine auf, die in MHC-Molekülen präsentiert werden können und erscheinen dem Immunsystem daher als normal. Andere haben ein oder mehrere MHC-Moleküle verloren oder exprimieren keine kostimulierenden Moleküle, die zur Aktivierung der naiver T-Zellen benötigt werden. Zweitens können Tumoren anfangs Antigene exprimieren, die das Immunsystem erkennt, diese dann aber aufgrund einer antikörperinduzierten Aufnahme in die Zelle oder aufgrund von antigener Variation verlieren. Wenn Tumoren durch Zellen angegriffen werden, die auf ein bestimmtes Antigen reagieren, dann haben alle Tumorzellen, die dieses Antigen nicht exprimieren, einen Selektionsvorteil. Drittens produzieren Tumoren auch oft Substanzen, wie etwa TGF- β , die die Immunantwort direkt unterdrücken.

Zu Ersterem zählt die Erkenntnis, dass die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Tumorzellen erniedrigt ist. Spectrin, Integrin und andere Oberflächenmoleküle sind notwendig um eine erste, unspezifische und temporäre Bindung zwischen der Tumorzelle und der T-Zelle zu ermöglichen. Ohne diese erste Kontaktaufnahme ist eine Immunantwort nicht möglich. Ähnlich dazu ist die niedrige Expression von MHC Klasse 1. In HNO-Tumoren zeigen 24% der Tumoren einen völligen Verlust von MHC Klasse 1 (Marincola et al. 2000). Eine spezifische Immunantwort ist in diesen Fällen unmöglich. Wie in vorhergehenden Kapiteln beschrieben, benötigen die T-Zellen ein kostimulatorisches Signal um eine Zelle angreifen zu können. Diese Signale werden von der Tumorzelle nicht mehr sezerniert bzw. exprimiert. Im Gegensatz zur unterdrückten Sekretion bzw. Expression von Molekülen die für die spezifische Immunantwort benötigt werden, wurde festgestellt, daß manche Tumorzellen Zytokine sezernieren die zu einer Toleranz der T-Zellen gegenüber der Tumorzelle führen. So wurde die Freisetzung von IL-10 nachgewiesen, welches die T_H -1 Zellen und die Freisetzung von Zytokinen aus den Makrophagen hemmt.

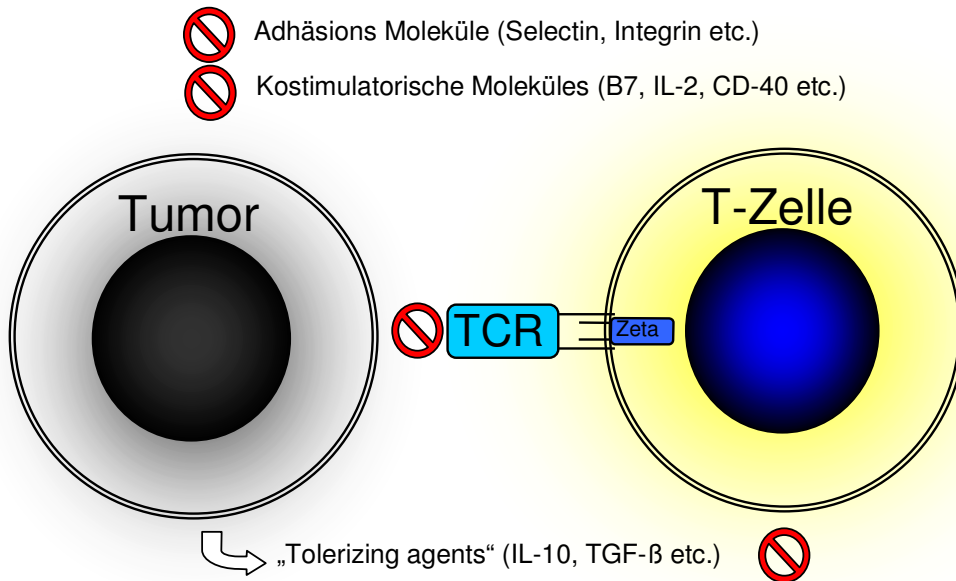


Abbildung 4. Stark vereinfachte Darstellung der Immune Escape Mechanismen des Tumors gegen den Angriff der T-Zelle. Die Tumorzelle entzieht sich dem Angriff der T-Zelle in dem keine oder nur wenige, für die T-Zellantwort wichtigen Adhäsionsmoleküle, exprimiert werden. Außerdem kommt es zu einer Herunterregulierung der MHC-Klasse I Moleküle, die wichtig sind für die Erkennung der T-Zelle über den T-Zellrezeptor. Zusätzlich werden von der Tumorzelle inhibitorische Zytokine freigesetzt, die immunologische Toleranz oder Ignoranz induzieren können.

Es erscheint so, als ob der einzelne Escape Mechanismus noch kein Ausschluß einer T-Zell spezifischen Immunantwort wäre, jedoch die Summe mehrerer dieser Mechanismen die Erkennung des Tumors durch das Immunsystem, unmöglich machen.

FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Eine maligne Erkrankung stellt keine lokale Erkrankung des Organismus dar, vielmehr muss das Auftreten einer Neoplasie als eine systemische Erkrankung gesehen werden. Im vorhergehenden Kapitel wurde die komplexe Wirkungsweise des Immunsystems dargestellt und kurz auf die Fähigkeiten des Tumors eingegangen, sich diesen zu entziehen. Immuntherapien können nur dann erfolgversprechend durchgeführt werden, wenn das Immunsystem in der Lage ist adäquat auf Antigene zu reagieren. In dieser Arbeit wurde zur Stimulation des Immunsystems folgender Ansatz gewählt.

Zur Überprüfung des Immunsystems sind verschiedene Methoden denkbar. Bei der hier vorliegenden Arbeit wurden Patienten der HNO-Poliklinik die an einem Plattenepithelkarzinom des Hals- und Mundbereiches (SCCHN) leiden auf das Merkmal der ζ -Kette hin überprüft. Die ζ -Kette ist ein mit dem T-Zellrezeptor assoziiertes, intrazelluläres Molekül, dem die Aufgabe der Signaltransduktion zufällt (vgl. Abbildung 1. und 4.). Ohne dieses Molekül ist eine spezifische Immunantwort zumindest erschwert, eventuell sogar unmöglich. Die Bestimmung der ζ -Kette in Lymphozyten des peripheren Blutes (PBMCs) und in tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) wurde als Marker für die Funktionalität des Immunsystems gewertet.

Über die Vakzinierung mit autologen Zellen des Immunsystems wurde in verschiedenen Fachrichtungen berichtet. Um zu untersuchen, ob die Erfolge dieser Studien sich auf das SCCHN übertragen lassen und um die angewendeten Methoden weiter zu effektivieren, führten wir diese in-vitro Studie durch.

In unserem Ansatz verwendeten wir hochgereinigte Tumor-Poly-RNA die mit Hilfe eines kationischen Lipids in die DCs transfizierte wurden. Der Vorteil von RNA Transfektion gegenüber der Beladung mit Tumorlysate oder Tumorpeptiden liegt darin, daß DCs die RNA direkt aufnehmen können und im Zytoplasma in Protein translatieren können, das dann über den MHC Klasse I und II präsentiert werden kann. Dadurch kann das gesamte Spektrum an Tumor Antigenen von einer antigenpräsentierenden Zelle abgedeckt und den T-Zellen präsentiert werden. Der Vorteil liegt auch in der Stimulation von sowohl CD-4 als auch CD-8 positiven T-Zellen, denn die Interaktion beider Subtypen ist für das Zustandekommen einer

effektiven Immunantwort wichtig (Ridell et al. 1999, Regn S. 2002). Bei der Peptidbeladung müssen spezifische MHC-Klasse-I Epitope bekannt sein, um Peptide definierter Länge und Sequenz binden zu können. Bei der Transfektion von Tumor-RNA steht ein uneingeschränkter Pool an Antigen zur Verfügung, da aus nur geringen Mengen von Tumormaterial, sogar einzelnen Zellen mit Hilfe der RT-PCR beliebige Mengen an RNA amplifiziert werden können.

Die so entstandenen dendritischen Zellen wurden in einem Proliferationsassay bezüglich ihres Stimulationspotentials auf Lymphozyten getestet. Als Referenzwerte wurden hierbei die nichttransfizierte DC verwendet sowie eine mit Tetanus Toxin inkubierte DC-Kultur. Tetanus Toxin stellt, als extremer Stimulus, einen Vergleichswert zu der jeweilig erreichten Stimulation dar. Wir führten diese Versuche in einem allogenen sowie einem autologen System durch. Um die Spezifität der so geprimten T-Zellen zu beweisen, wurde ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt, in dem radioaktiv-markierte Tumorzellen von T-Zellen spezifisch lysiert werden.

So läßt sich der Inhalt dieser Arbeit mit der Entwicklung einer effektiven Methode zur antitumoralen Zellvakzinierung mit DCs und einer Auswahlmethode der davon profitierenden Patienten beschreiben.

MATERIAL UND METHODEN

GERÄTE

Gerät	Firma
Inkubationsschrank für die Zellkultur	Heraeus
Sterile Werkbank (Laminar Airflow)	Heraeus
Wasserbad	Grant
MIKROSKOP AXIOVERT	Zeiss
Durchflußzytometer FACS Calibur	Becton Dickinson
Bestrahlungsanlage	Gamma Cell
TOPCounter	Packard Dreieich
Cell Harvester	Packard Dreieich
Spectrophotometer DU-64	Beckmann
Zentrifuge	Heraeus
Kühlschränke	Liebherr
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80 °C)	New Brunswick
Stickstofftank für die Langzeitlagerung (-196 °C)	Messer-Griesheim
Vortexer M25 Minishaker	IKA
Eismaschine	Ziegra
Neubauer Zählkammer	Brand
Mikropipetten : 0,5-2µl, 2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl	Eppendorf
Variopette (Stepper) Eppendorf	Eppendorf
Multipette 4780 Eppendorf	Eppendorf
Pipettierhilfe	IBS Integra Bioscience
SuperMACS- Magnetischer Seperator	Miltenyi

VERBRAUCHSMATERIALIEN

Einweg-Pipetten: 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	PESKE OHG
Sterile Einweg- Pasteurpipetten (Pastetten) 2ml	PESKE OHG
Zellkulturflaschen: 25ml, 75ml, 150ml	Peske OHG
Zellkulturplatten, (24 Well und 6 Well)	Peske OHG
96 Well- Rund-und Flachbodenplatten	Peske OHG
96 Well- Spitzbodenplatten	Nunc
Sterile Serumfläschchen (60ml)	Nalgene
Pipettenspitzen (2-10µl, 10-200µl, 100-1000µl)	Peske OHG
96 Well-Unifilter Platten	Packard
96 Well-Luma-Platten	Packard
Kryoröhrchen	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15ml und 50ml)	Peske OHG
Zentrifugenröhrchen aus Polystyrol (15ml)	Peske OHG
MACS-Säulen (VS/LS)	Miltenyi
FACS-Röhrchen	Peske OHG
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf

ZELLKULTURMEDIEN UND REAGENZIEN

RPMI 1640	ohne L-Glutamin, mit 2.0 g/L NaHCO ₃ steril filtriert (Cellconcepts, Umkirch).
X-Vivo-15	Serumfreies Medium (BioWhittaker, Maryland, USA)
OptiMEM	Serumfreies Medium (GIBCO-BRL, Karlsruhe)
PBS	Phosphate-buffered saline, ohne Calcium oder Magnesium, steril filtriert (Cellconcepts, Umkirch)
MACS Puffer	PBS + 2mM EDTA + 0,2% BSA
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin) (Sigma chemicals, Deisenhofen)

ZUSÄTZE VON ZELLKULTURMEDIEN

Penicillin-Streptomycin 1000 IU/ml (GIBCO-Life Technologies, Karlsruhe)

L-Glutamin 200 nM (100x) (GIBCO- Life Technologies)

SEREN

FCS Fetal calf serum (Sigma, Deisenhofen)

Humanserum (PAN Systems)

ZYTOKINE

GM-CSF Granulozyte-macrophage-colony-stimulating-factor,
„Leukomax“(Essex Pharma GmbH, München)

IL-4 Interleukin -4 (Hölzel Diagnostika, Köln).

IL-2 Interleukin -2 (Promocell, Heidelberg)

TNF- α Tumor necrosis factor alpha (Hölzel Diagnostika, Köln,)

CHEMIKALIEN

Ficoll-Hypaque spezifische Dichte =1.078 g/ml, (Biocoll, Biochrom, Berlin)

Trypan Blue Solution 0.4 % (Sigma chemicals, Deissenhofen)

Versene Gibco (Life Technologies Karlsruhe)

³H-Thymidine Amersham (Life Science, Buckinghamshire, UK)

Cr-51(Chromium) NaCr-51, 185 mBq, (NEN Life Science, Niederlande)

DMSO Dimethyl sulfoxide (Sigma, Deisenhofen)

Heparin 25000 IE (Essex Pharma)

TT Tetanustoxin Fragment C (Chiron Behring GmbH, Marburg)

Triton X-100 5 % (Sigma, Deisenhofen)

HEPES Hydroxyethyl-piperazine ethanesulfonic acid (Biochrom)

DOTAP Liposomales Transfektions Reagenz (Roche
 Diagnostics GmbH)
 EDTA (Sigma, Deisenhofen).

ANTIKÖRPER (MAUS ANTI HUMAN)

ANTIKÖRPER ZUR CHARAKTERISIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN

Antikörper-Klon	Spezifität	Markierung	Firma/Herkunft
4-BDG	ζ-Kette	FITC	Serotec, UK
UCHT1	CD3	FITC, PE	DAKO
BF5	CD4	PE	Diaclone (Hölzel Diagnostika)
DK25	CD8	PE	Diaclone (Hölzel Diagnostika)
MOC-1	CD56	PE	Diaclone (Hölzel Diagnostika)
3G8	CD16	PE	Pharmingen
M-A251	CD25	FITC	DAKO

ANTIKÖRPER ZUR CHARAKTERISIERUNG VON DENDRITISCHEN ZELLEN

Antikörper-Klon	Spezifität	Markierung	Firma/ Herkunft
B-B5	CD1a	FITC	Diaclone (Hölzel Diagnostika)
B-ly6	CD11c	PE	Pharmingen
5C3	CD40	PE, FITC	Pharmingen
L307.4	CD80	PE, FITC	Pharmingen
2331 (FUN-1)	CD86	PE, FITC	Pharmingen
HA-58	CD54	FITC	Pharmingen
HB15e	CD83	PE	Immunotech
G46-2.6	HLA-ABC	PE, FITC	Pharmingen
CR3/43	HLA-DR	PE, FITC	Pharmingen
BA8	CD14	PE	DAKO

HD37	CD19	FITC	DAKO
TRAP1	CD40L	PE	Pharmingen

INHIBIERENDE ANTIKÖRPER

Klon	Spezifität	Firma
W6/32	HLA-ABC	DAKO
CR3/43	HLA-DR	DAKO

STIMULIERENDE ANTIKÖRPER

Klon	Spezifität	Firma
OKT-3	CD3	Diaclone Hölzel

ISOTYPKONTROLLEN UND SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

Spezifität	Markierung	Firma
IgG [F(ab) ₂]-goat anti mouse	FITC	Diaclone Hölzel
IgG1 κ Isotyp	FITC	Pharmingen
IgG1 κ Isotyp	PE	Pharmingen
IgG2 α klisotyp	pur	Dako

ZELLINIEN UND HERKUNFT

GHD	Stabile Tumorzelllinie eines Plattenepithelkarzinoms aus dem Larynx
Hela-Zellen	ATCC (American Type Culture Collection Rockville USA)
Humane Fibroblasten	Karin Oettrich (Labor Prof. Kolb)
LCLs	Diese wurden hergestellt aus Patientenblut, dem Blut freiwilliger gesunder Spender der Arbeitsgruppe, sowie

aus "Buffycoats" die vom Bayrischen Roten Kreuz bezogen wurden.

HSB2

(NK-sensitive T Zelllinie) Dr. Marie Roskrow (Labor Prof. M. Brenner)

TECHNIKEN

ZELLKULTUR

EXTRAKTION VON MONONUKLEÄREN ZELLEN DES PERIPHEREN BLUTES (PBL)

Das für diese Arbeit verwendete Blut wurde entweder als Vollblut (50-100 ml), aus der Armvene von gesunden freiwilligen Spendern entnommen oder stammte von leukozytenhaltigen Präparaten („buffy coats“) des Bayerischen Roten Kreuzes. Das Blut wurde mit sterilen Einmalspritzen entnommen, denen 0.1 ml (500 IU) Heparin Novo pro 10 ml Blut beigesetzt war, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Das so behandelte Blut wurde unmittelbar für die entsprechenden Experimente weiterverarbeitet.

Die serologische Überprüfung aller Blutspendeproben zeigten Immunglobuline sowohl gegen AdV als auch gegen EBV. Dies wurde vom Institut für medizinische Mikrobiologie des Max von Pettenkofer Institutes, München bestätigt. Alle folgenden im Zusammenhang mit Zellseparation und Zellkultivierung beschriebenen Vorgänge wurden unter strikt sterilen Bedingungen vorgenommen. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden mittels Ficoll-Hypaque (spezifische Dichte = 1,078) Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dabei wurde das Blut zunächst im Verhältnis 1:1 mit Dulbeccos-PBS verdünnt. In 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 20 ml Ficollösung vorgelegt, auf die das verdünnte Blut vorsichtig mit einer 10ml Pipette überschichtet wurde. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 800 g hat sich die mononukleäre Fraktion der Lymphozyten und Monozyten aufgrund ihrer geringeren Dichte deutlich von den Erythrozyten, den Granulozyten abgegrenzt. Während letztere durch das Ficoll-Hypaque hindurch zentrifugiert wurden, bildeten die mononukleären Zellen eine milchige Scheibe, die leicht aus dem Ficoll mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette aufgenommen werden konnte. Diese Zellen wurden dann in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und im Verhältnis 1:1 mit Dulbeccos-PBS gewaschen und 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand abgesaugt und das Pellet nach leichtem Aufschütteln in 50ml Dulbeccos-PBS aufgenommen und 10 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wieder abgesaugt, das Pellet kurz aufgeschüttelt und in 10 - 20 ml RPMI-1640 Medium aufgenommen und sorgfältig durchmischt. Die Zellen wurden anschließend mit einem Hämatozytometer gezählt.

ZÄHLEN VON ZELLEN

Die Anzahl lebender Zellen wurde durch Anfärben mit Trypanblau bestimmt. Lebende Zellen nehmen dabei den blauen Farbstoff nicht auf, während sich tote Zellen dunkelblau anfärben. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Das Gemisch wurde dann gut gemischt und vorsichtig 10µl der Suspension in die Zählkammer eines Neubauer-Hämatozytometer gefüllt. Mit Hilfe eines inversen Mikroskops wurde die Anzahl der lebenden, ungefärbten Zellen in den vier Zählquadraten, die in 16 Einzelquadraten unterteilt sind, gezählt. Die Zellkonzentration pro ml und die Gesamtzellzahl pro Probe wurde wie folgt ermittelt:

$\frac{\text{Gezählte Zellzahl} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 1 \cdot 10^4}{4} = \text{Zellzahl pro ml}$
$\text{Zellzahl pro ml} \times \text{Ausgangsvolumen} = \text{Gesamtzellzahl}$

KRYOKONSERVIERUNG VON ZELLEN

Die Zellen wurden in einem totalen Volumen von $1-2 \times 10^7$ /ml in 1ml Einfriermedium pro Kryoröhrchen eingefroren.

Das Einfriermedium (90 % FCS und 10 % DMSO) und die Kryogefäße wurden vor dem Einfrieren auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden in 50- oder 15 ml Zentrifugenröhrchen mittels Zentrifugieren pellettiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet aufgeschüttelt und auf Eis gekühlt. Anschließend wurde das kalte Einfriermedium vorsichtig zu den Zellen gegeben, wobei durch leichtes Schütteln des Röhrchens die Zellen möglichst gleichmäßig mit dem Einfriermedium durchmischt wurden.

Aus dieser Zellsuspension, wurden jeweils 1ml in die zuvor ebenfalls gekühlten und beschrifteten Kryoröhrchen gefüllt. Diese wurden dann sofort in eine Spezial-Einfrierbox überführt, bei -80°C für 24 Stunden gelagert und anschließend zur Langzeitkryokonservierung in Behälter mit flüssigen Stickstoff transferiert.

AUFTAUEN VON ZELLEN

Zum Auftauen von Zellen wurden 6 ml 37°C warmes RPMI-1640 + 20 % FCS als Auftaumedium verwendet und in 15 ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt.

Die Kryogefäße wurden direkt aus dem Behälter mit flüssigem Stickstoff entnommen und sofort für kurze Zeit in einem Wasserbad von 37 °C aufgetaut. Es wurde darauf geachtet, daß nicht der gesamte Inhalt des Gefäßes auftaut, sondern noch ein kleiner gefrorener Anteil im Innern des Gefäßes verblieb.

Ein Milliliter des Auftaumediums wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette in das Kryogefäß pipettiert und dabei auch das letzte Klümpchen geschmolzen. Die Zellsuspension wurde dann, mit Hilfe der Pasteurpipette tropfenweise in das 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, das kontinuierlich leicht geschüttelt wurde.

Die Zellen wurden dann zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt und in einem geeigneten Volumen von komplettem Medium aufgenommen und für weitere Experimente verwendet.

KULTUR VON ADHÄRENTEN ZELLINIEN (GHD, HUMANE FIBROBLASTEN)

Die murine Fibroblasten Zelllinie L-CD40L wurde nach bereits beschriebener Methodik aufgetaut und in 6ml kompletten RPMI-1640 Medium aufgenommen und danach in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgelegt. Nach 24 h hatten sich ca. 60 % aller Zellen auf dem Flaschenboden angeheftet. Nach weiteren 18- 24 h war der gesamte Flaschenboden mit einem konfluenten Zellrasen bedeckt, man nennt dies Konfluenz. Das Passagieren dieser Zellen wurde wie folgt durchgeführt. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und 5 ml PBS in die Kulturflasche gegeben. Unter kreisenden Bewegungen wurde das PBS auf den Zellen verteilt um einen Wascheffekt zu erzielen. Danach wurde das PBS abgesaugt und ca. 500 µl Versene zugegeben, ein Trypsinderivat, das die Zell-Zellkontakte lösen soll. Das Versene wurde durch Klopfen und Kreisen der Kulturflaschen gut verteilt und anschließend für 5 Min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Ablösung der Zellen im Mikroskop kontrolliert. Zum vollständigen Ablösen der Zellen mußten diese vom Flaschenboden abgeklopft werden und in ca. 5- 10 ml CM aufgenommen werden. Nach einem Waschschrift um das Versene gründlich zu entfernen, wurde diese Zellsuspension dann in 75 cm² Zellkulturflaschen transferiert und mit komplettem RPMI-1640 Medium auf ein Gesamtvolumen von 15 ml aufgefüllt.

KULTUR VON DENDRITISCHEN ZELLEN (DCs)

PBL wurden in serumfreien RPMI-1640 in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ pro ml in 6-Well-Platten ausgesät, mit einer Gesamtzellzahl von 5×10^6 Zellen pro Well. Die Platten wurden dann für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Absetzen der adhärennten Zellfraktion wurde der Überstand vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette von der adhärennten Zellschicht heruntergewaschen, so dass das gesamte Kulturmedium mit den nicht-adhärennten Zellen entfernt wurde, diese wurden für den späteren Gebrauch aufgehoben. Die adhärennten Zellen wurden weiter kultiviert unter Zugabe von 2 ml serumfreien Medium (X-VIVO-15), supplementiert mit 2 mM L-Glutamin und Penicillin-Streptomycin (100 U/ml und 100 µg/ml), sowie 800 IU/ml rekombinantem humanes GM-CSF und 500 IU/ml rekombinantem human IL-4. Nach sieben Tagen in Kultur wurde frisches rhGM-CSF (800 IU/ml) dem Kulturmedium zugegeben und nach 10-12 Tagen Zellkultur die unreifen DCs geerntet und für weiterführende Experimente verwendet.

PHÄNOTYPISCHE ANALYSE VON DCs

Zur Charakterisierung von DCs mittels direkter Immunfluoreszenz wurden die folgenden monoklonalen Antikörper verwendet, die entweder mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) direktmarkiert waren: CD-1a (FITC,-oder PE-konjugiert), CD-11c-PE, CD-11a –FITC, CD-123-PE, CD-25-FITC, CD-40 (FITC,-oder PE-konjugiert), CD-80, CD-86, (FITC,-oder PE-konjugiert), CD-51-PE, HLA-ABC und HLA-DR (FITC,-oder PE-konjugiert), CD-19-FITC, CD-83-PE und CD-14-PE

BESTIMMUNG DER ENDOZYTOTISCHEN KAPAZITÄT VON DCs

Die Mannoserezeptor vermittelte Endozytose stellt experimentell ein Maß dar, für die Fähigkeit DCs Moleküle aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren. Aufgrund multipler Kohlenhydratbindungsdomänen des Mannoserezeptors, sind DCs befähigt große Mengen an Glykoproteinen zu binden und zu internalisieren. Im Gegensatz zu Fc-Rezeptoren, die zusammen mit ihren Liganden degradiert werden, entläßt der Mannoserezeptor seine Liganden bei einem endosomalen pH in endosomale Vesikel und wird dabei selbst wieder verwendet. Daher kann eine

große Menge von verschiedenen Liganden gebunden und aufgenommen werden, bei einer relativ niedrigen Menge an Rezeptoren.

FITC-konjugiertes Dextran (MW:70000) wurde mit serumfreien Medium zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml verdünnt.

DCs wurden in einer Konzentration von 1×10^5 pro Test in 100 μ l X-VIVO 15 eingestellt und mit 100 μ l der FITC-Dextranlösung versetzt. Das Gesamtvolumen betrug dabei 200 μ l und wurde bei 37 °C inkubiert.

Es wurden doppelte Testansätze vorbereitet und bei einer Kinetik von 30-180 Min. wurden die Zellen aus dem Inkubator entnommen und 2 x mit kaltem PBS gewaschen und in 500 μ l FACS-Puffer aufgenommen und die Menge an aufgenommene FITC-Dextran im FACS Gerät gemessen. Unbehandelte DCs dienten dabei als Negativkontrolle.

DURCHFLUßZYTOMETRISCHE ANALYSEN

Der Fluoreszenzaktivierte Zellsorter (fluorescence-activated cell sorter = FACS) kann nicht nur Zellen nach Größe und Granularität einordnen, sondern auch zählen und gemäß ihrer Oberflächenmarkierung auftrennen und quantifizieren. Monoklonale Antikörper gegen verschiedene Oberflächenproteine werden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, um bestimmte Zellen in einer gemischten Population detektieren zu können. Das Gemisch der markierten Zellen wird angesaugt und anschließend durch eine Kapillare gedrückt. Dadurch entsteht ein feiner Flüssigkeitsstrahl mit vereinzelt Zellen, die sich in bestimmten Abständen befinden. Dieser Flüssigkeitsstrahl passiert einen Laserstrahl, dabei kommt es an den Zellen zu einer Lichtstreuung und die Farbstoffmoleküle, die über die monoklonalen Antikörper an die Zelle gebunden sind werden zur Fluoreszenz angeregt. Empfindliche Photodetektoren messen sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht, wobei ersteres Informationen über Größe und Granularität der Zelle liefert, die Fluoreszenz ermöglicht dagegen Aussagen über die Bindung der monoklonalen Antikörper und damit über die Expression der Oberflächenproteine auf jeder untersuchten Zelle.

FÄRBUNG MIT FLOURESZENZMARKIERTEN MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

Das Anfärben der DCs mittels direkter 2-Farben-Immunfluoreszenzmarkierung wurde wie folgt durchgeführt:

Ernten der Zellen durch sorgfältiges Abpipettieren der Zellen vom Plattenboden unter Zuhilfenahme einer Plastikpastette und transferieren in ein Zentrifugenröhrchen. Die Zellen wurden 2 mal mit FACS-Puffer (PBS + 2 % FCS) gewaschen. Aufnehmen des Pellets in einer geeigneten Menge von FACS Puffer und verteilen von jeweils 100 µl der Zellsuspension in Durchflusszytometrie-Teströhrchen (FACS-tubes) pro Färbung.

Zugabe von jeweils 2-3 µl des Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und des Phycoerythrin (PE)-konjugierten monoklonalen Antikörpers (mAb).

Inkubieren der Teströhrchen im Dunkeln für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Zugabe von 800 µl FACS-Puffer und zentrifugieren für 5 Min. bei 400 g. Verwerfen des Überstandes und erneute Zugabe von 800 µl FACS-Puffer. Zentrifugieren für 5 Min. bei 400 g

Aufnahme des Pellets in 500 µl FACS-Puffer und Analyse der Oberflächenmarker in der Durchflußzytometrie

IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG DER PROLIFERIERENDEN AUTOLOGEN UND ALLOGENEN T-ZELLEN

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression spezifischer T-Zellmarker wurden die T-Zellen mit verschiedenen Kombinationen von FITC-oder PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern inkubiert und anschließend in der Durchflusszytometrie ausgewertet. Eingesetzt wurden dazu folgende Antikörper: CD-3, CD-8, CD-4, CD-56.

DOPPELFÄRBUNG ZUR INTRAZELLULÄREN FÄRBUNG DER TCR ζ-KETTE

Die Expression der ζ-Kette des T-Zellrezeptors wurde quantitativ mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Aufgrund der intrazellulären Lage der ζ-Kette ist ein Anfärben des Moleküls erst nach Permeabilisierung der Zellmembran möglich.

PBMC's (1×10^6 Zellen) und TIL's wurden nach zweimaligem Waschen mit gelöstem 1% Saponin Pulver (Riedel-de Haean) inkubiert, um dem ζ -Ketten-Antikörper den Durchtritt durch die Zellmembran zu ermöglichen, Anschließend folgte eine Inkubation mit dem Antikörper (Serotec, U.K.) oder der Isotypkontrolle (Pharmingen, San Diego, CA) für 30 Minuten bei 4° C. Nach zweifachem Waschen der Zellen wurden die Zellen mit 2,5% HEPES Lösung inkubiert, um die permeable Zellmembran wieder zu schließen. Der zweite Färbeschritt des extrazellulären CD-3 Moleküls verlangt eine intakte Zellmembran. Nach einem Waschvorgang wurde deshalb mit einem Phycoerytrin-markierten Antikörper gegen CD-3 (Serotec U.K.) für 30 Minuten bei 4°C gefärbt. Nach erneuten Waschschritten wurden die Zellen an einem Durchflusszytometer (Becton Dickinson) analysiert. Es wurden jeweils 10.000 Zellen bewertet. Die Grenzen wurden auf die klassische Lymphozytenfraktion eingestellt.

BEARBEITUNG DER TUMOR PROBEN SOWIE ZELLTRENNUNG

Das aus dem OP erhaltenen Tumorgewebe dient als Ausgangsmaterial zur Gewinnung sowohl der TILs (= Tumor infiltrating lymphocyt) als der autologen Tumor-RNA. Von der verbreiteten Methode, die TILs mit Hilfe von IL-2 aus dem intakten Gewebestück mittels Chemotaxie zu locken, wurde hier Abstand genommen, um den Rezeptorstatus auf der Zielzelle so unverändert wie möglich zu erhalten. Der alternativ gewählte Weg ging deshalb über die Herstellung einer Einzellsuspension, aus der über einen Dichtegradienten die mononukleären Zellen separiert wurden.

Im Durchschnitt lag die Größe der zur Verfügung stehenden Tumorstücke zwischen 0,2 cm³ und 1 cm³. Die befallenen Lymphknoten, die eine Größe von bis zu 5cm³ erreichten, mußten aus ihrer Kapsel gelöst werden um dann analog dem Tumorgewebe verarbeitet.

Das Gewebe wird unter sterilen Bedingung unter einer laminar Airflow mit einem Skalpell zerkleinert, bis es jegliche Konsistenz verliert. Der so entstandene Zellbrei wurde mit sterilem Phosphatpuffer aufgenommen und in einem Mörser zerkleinert. Um nun die bindegewebigen Anteile von der Zellsuspension zu trennen, wurde das Gemisch über ein Sieb mit der Porengröße 40µm gegeben.

Die nun erhaltene Zellsuspension zeigt sich unter lichtmikroskopischer Betrachtung schon als hauptsächlich singuläres Zellgemisch.

Um nun eine möglichst reine Tumorzellpopulation von den TILs zu trennen wird Ficoll-Hypaque (spezifische Dichte = 1,078) verwendet (Vgl. 2.10.1.1). Um diese Trennungsmethode zu verwenden werden 15ml Ficoll Dichtegradient mit der in 20ml PBS aufgenommenen Zellsuspension überschichtet. Bei einer Zentrifugation von 400g über 25min findet die Auftrennung statt. Die Lymphozyten werden abpipettiert und gewaschen. Die restlichen Zellen, die nun einen hohen Prozentsatz an Tumorzellen aufweisen und sich als Bodensatz finden werden ebenfalls in PBS gewaschen.

GEWINNUNG VON TUMOR-POLY-RNA

Die so hergestellte Tumor-Einzelzellsuspension wird verwendet um, die für die Transfektion benötigte Tumor-Poly-RNA herzustellen. Dazu wird den Zellen ein Lysepuffer zugeführt. Das nun entstandene Gemisch wird über eine Affinitätsminisäule geschichtet und für 10min bei 1000g zentrifugiert. Die Säule wird nun mit RNAase freiem Wasser mehrmals gewaschen um die gebundene RNA zu elutieren. Die Reinheit und Konzentration der so erhaltenen autologen Tumor-Poly-RNA wurde im Spektrometer bestimmt. Dabei wurden durchschnittlich 50-100 µl mit einem Gehalt von 1-5 µg PolyRNA gewonnen.

TRANSFEKTION VON DCs MIT DOTAP

Die gewonnen Poly-RNA wurde in der benötigten Menge an infektiösen Partikel mit 50 µl OptiMEM in einem 1,5ml Eppendorf -Reaktionsgefäß verdünnt. In einem zweiten 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 1.25 µg des kationischen Lipids DOTAP in 50 µl OptiMem gelöst.

Anschließend wurden das Lipidgemisch vorsichtig mit einer Eppendorfpipette zu dem RNA Gemisch gegeben wurde, um Scherkräfte zu vermeiden. Durch leichtes Klopfen gegen die Wand des Reaktionsgefäßes wurde eine Vermischung beider Lösungen erzielt. Anschließend wurde das Gemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die DCs geerntet, gewaschen und mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen in 100 µl OptiMEM

eingestellt. Nach Ende der 15 minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen mit dem RNA-Lipidgemisch vereinigt und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 2ml X-VIVO 15 unter Zugabe von 400 U/ml GM-CSF und 200 U/ml TNF- α aufgenommen und in ein Well einer 24-Well- Platte transferiert.

HERSTELLUNG EBV-TRANSFORMierter B-ZELL- LINIEN (LCL)

PBL wurden in komplettem RPMI-1640 zu einer Konzentration von 5×10^6 Zellen pro Well in 24-Well Zellkulturplatten angesetzt. Die transformierenden Eigenschaften des EBV-haltigen B-95-8 Überstandes wurden durch limitierende Verdünnungsreihen zwischen 100 und 1000 μ l an seronegativen und seropositiven Spendern getestet und eine Menge von 300- 500 μ l des Überstandes wurde als ideal für eine ausreichende Transfektion erachtet. Die Zellen wurde mit dem Überstand für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde 1 μ g/ml Cyclosporin A hinzugegeben, dies führt zu dem sogenannten „T-Cell-knockout“ und verhindert eventuelle Abwehrreaktionen. Nach 7 Tagen in Kultur wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und nach ca. vier Wochen waren die Zell-Linien etabliert und konnten in 25 cm² Zellkulturflaschen expandiert werden. Nach Expansion in 75 cm² Zellkulturflaschen wurden in regelmäßigen Abständen Aliquots der Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff kryokonserviert.

ASSAYS

GEMISCHTE LYMPHOZYTEN REAKTION (MLR = MIXED LYMPHOYTE REACTION)

Die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR= „mixed lymphocyte reaction“) ist ein Experiment, das ursprünglich als Modell für die Transplantatabstoßung entwickelt wurde. Bestrahlte Lymphozyten eines potentiellen Spenders (=Stimulatorzellen) wurde mit unbestrahlten Lymphozyten eines Empfängers (= Responder-T-Zellen) zusammengemischt. Sind Spender und Empfänger in ihren HLA-Antigenen unterschiedlich, dann werden die T- Zellen in der Lymphozytenkultur des Empfängers zur Proliferation angeregt, weil sie gegen diese HLA-Antigene reagieren und entwickeln sich durch die resultierende Zytokinproduktion zu Killerzellen. Die MLR kann daher als Maß für die immunstimulatorische Kapazität

von APCs, wie DCs oder LCLs eingesetzt werden. In autologen und allogenen Testsystemen sollte die Kapazität RNA-infizierter DCs untersucht werden die Proliferation von T-Zellen zu induzieren.

Die Vorbereitung ist bei allogenen und autologen MLR identisch: Aus frischem Spenderblut isolierte PBL wurden zur Aufreinigung von T-Zellen verwendet. Dazu wurde das MACS Pan T Cell Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Nach der Isolation der PBL über den Ficoll Gradienten wurden die Zellen gewaschen und gezählt. Jeweils 1×10^7 Zellen wurden in 80 μ l MACS-Puffer aufgenommen und mit 20 μ l des Hapten-Antibody-Cocktail (enthält eine Mixtur aus monoklonalen haptenkonjugierten Antikörpern: CD11b, CD19, CD36 und CD56) vermischt und bei 6-12°C in einem Eis-Wassergemisch für 10 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen 2 mal mit MACS-Puffer gewaschen und anschließend erneut in 80 μ l MACS-Puffer aufgenommen und mit 20 μ l der MACS Anti-Hapten Microbeads (enthält magnetische Teilchen, die an monoklonale anti-Hapten Antikörper gebunden sind) versetzt und gut durchmischt. Die Zellsuspension wurde dann für weitere 15 min bei 6-12°C in dem Eis-Wassergemisch inkubiert. Danach wurden die Zellen 1 mal gewaschen und in einem Volumen von 500 μ l MACS-Puffer aufgenommen.

Zur T-Zell-Depletion wurden mit feiner Stahlwolle (oder Kügelchen) gefüllte LS+/VS+-Säulen an einem Magneten (MidiMACS, VarioMACS oder SuperMACS) befestigt und mit 3 ml MACS-Puffer befeuchtet. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und die durchlaufende Fraktion in einem Röhrchen gesammelt. Alle Zellen, die nicht den T-Zellen entsprachen, blieben aufgrund der Markierung mit den Antikörper-Microbeads in der Säule hängen, während die unmarkierte negative Fraktion hochangereicherte CD3⁺ T-Zellen enthielt. Um eine möglichst hohe Ausbeute an separierten T-Zellen von der Säule zu gewinnen, wurde diese noch viermal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen.

Die Eluate wurden vereinigt, zentrifugiert, noch einmal mit PBS gewaschen und schließlich in einem entsprechenden Volumen von komplettem Medium aufgenommen, gezählt und für weitere Analyse weiterverwendet. Die Reinheit der T-Zellen wurde durch Markierung mit einem anti-CD3-Antikörper in der Durchflusszytometrie evaluiert. Für den Ansatz in der MLR wurden die T-Zellen auf 1×10^6 /ml eingestellt und pro 100 μ l in 96-Well-Rundbodenplatten gesät. Die

antigenpräsentierenden Stimulatorzellen (DCs oder LCLs) wurden zunächst bestrahlt (30 Gy für DCs und 45 Gy für LCLs) und in verschiedenen Ratios in dreier Gruppen (Triplikate) zu den T-Zellen gegeben. Aufgrund der individuellen Unterschiede in der Reinheit der verschiedenen DC-Kulturen wurden die DCs immer sehr genau und sorgfältig auf die entsprechende Zellkonzentrationen eingestellt. Dabei wurde zunächst die Quantität der DCs im FACS evaluiert und anschließend die deutlich größeren Zellen gezählt während die kleineren Lymphozyten ignoriert wurden. Da LCLs relativ homogene Zellsuspensionskulturen darstellen, war hier das Einstellen auf die jeweilige Zellzahl einfacher. Die Endkonzentration in jedem Well betrug 200 µl. Jeweils drei Wells wurden mit T-Zellen alleine als negative Kontrolle versehen. Nach 6 Tagen in Kultur wurde 1 µCi von Methyl-[3H]Thymidin der Kultur zugegeben und für weitere 18 Stunden inkubiert. Nur sich replizierende T-Zellen können das Methyl-[3H]Thymidin in ihre DNA einbauen. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die [3H]Thymidin –markierten Zellen in den 96-Well-Rundbodenplatten mit Hilfe eines FilterMate™ Cell Harvester auf speziell entwickelte UniFilter-Platten transferiert und die Aufnahme des Thymidins wurde als emittierende Gamma-Strahlung im Liquid-Scintillations-Verfahren mit Hilfe eines Packard Topcounters quantifiziert. Als Maß für die Proliferation wurden counts per minute (CPM) angegeben, welche die Menge des eingebauten Thymidins repräsentieren. Die proliferierenden T-Zellen in der MLR wurden in der FACS –Analyse phänotypisiert, dabei wurden die oben beschriebenen Antikörper eingesetzt.

Unreife dendritische Zellen sind in der Lage exogene Antigene aufzunehmen und sie den T-Zellen zu präsentieren. Um diese Fähigkeit der DCs zu testen wurden RNA-infizierte DCs oder nicht infizierte DCs in komplettem Medium resuspendiert, das 20mg/ml rekombinantes Tetanus Toxoid (TT) Fragment C (Chiron Behring, Marburg) enthielt oder ohne Zusatz war. Nach 24 Stunden wurden die Zellen bestrahlt (30 Gy) und in Triplikaten zu den aufgereinigten T-Zellen (1×10^5 / Well) in verschiedenen Stimulator:T-Zell Ratios in 96-Well Rundbodenplatten gegeben. Nach 5 Tagen in Kultur wurde 1 µCi Methyl-[3H]Thymidin der Kultur zugegeben und für weitere 18 Stunden inkubiert. Danach wurde dann wie bereits beschrieben der Einbau des Thymidins in die proliferierenden Zellen quantifiziert.

Bei allogenen MLR sind die Stimulatoren und die Effektoren von verschiedenen Spendern. In der autologen MLR werden nur Zellen verwendet, die von einem Spender stammen.

STANDARD CHROMFREISETZUNGS TEST (CHROMIUM-51 RELEASE ASSAYS)

Allgemeine Vorbereitungen zum Chromfreisetzung Test: Autologe dendritische Zellen wurden aus frischem Blut oder von eingefrorenen PBL von „buffycoats“ 14 Tage vor der Durchführung des Assays wie beschrieben generiert.

Dabei mußten die Menge so kalkuliert werden, daß folgende Zielzellen hergestellt werden konnten:

- Nicht infizierte dendritische Zellen
- Dendritische Zellen infiziert mit autologer Tumor-Poly-RNA

In der gleichen Weise wurden allogene dendritische Zellen von HLA-nicht identischen Spendern oder von „buffycoats“ mit der Annahme nicht übereinstimmender HLA-Typen generiert.

Darüber hinaus dienten autologe LCLs, allogene LCLs und die NK-sensitive Zell-Linie HSB2 als weitere Zielzellen.

Der Chromfreisetzung Test dient zur Überprüfung der spezifischen Zell-vermittelnden Zytotoxizität. Die CTLs wurden geerntet und in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen /ml in komplettem RPMI aufgenommen. 96 Well Spitzbodenplatten wurden von Reihe B bis D mit jeweils 100µl komplettem RPMI pro Well gefüllt. In die oberste Reihe A, wurden 200 µl der CTL-Suspension gefüllt. Mit Hilfe einer 12-Kanal Multipette wurden dann jeweils 100 µl, angefangen bei Reihe A in die jeweils tiefer liegende Reihe pipettiert. Bei jedem Transferschritt wurden dann Zellsuspension und Medium sorgfältig durch zahlreiches Auf- und Abpipettieren durchmischt um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen. Bei Reihe D schließlich wurden 100 µl verworfen, da hier die Verdünnungskaskade beendet wurde. Die Reihen E und F waren für die HLA-Inhibitionsexperimente vorgesehen. In Reihe G wurden 100µl Medium und später die Chrom markierten Zielzellen für die Ermittlung der spontanen Chromfreisetzung gegeben und in Reihe H wurde schließlich das Detergenz Triton-X zugegeben, um die maximalen Freisetzung des gespeicherten Chroms zu bestimmen.

Die Zielzellen wurden geerntet, abzentrifugiert und in 50 µl komplettem RPMI resuspendiert und je nach Kalibrierungsdatum mit 30- 60 µl der verdünnten Natriumchromatlösung (⁵¹Cr-Isotop; 0,1 mCi am Kalibrationstag) für 60 Minuten bei 37°C im Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 5 ml komplettem RPMI gewaschen und schließlich in 1ml komplettem RPMI aufgenommen, gezählt und auf 2x10⁴/ml eingestellt. Die so eingestellten Zielzellen wurden dann zu den wie oben beschriebenen CTLs gegeben, wobei pro CTL zu Zielzell Ratios dreier Ansätze gewählt wurden. Anschließend wurde dieser Testansatz für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Das während dieser Zeit an das Medium abgegebene Chrom kann als ein direktes Maß für die Lyse durch die Effektorzellen bzw. für die spontane Radioaktivitätsabgabe einer jeden Zielzelle gewertet werden.

Abbildung 5 gibt einen schematischen Überblick über die experimentelle Anordnung der CTLs und ihren Zielzellen in der Platte

	1 Target 1	2 Target 1	3 Target 1	4 Target 2	5 Target 2	6 Target 2	7 Target 3	8 Target 3	9 Target 3	10 Target 4	11 Target 4	12 Target 4
A	40:1	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
B	20:1	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
C	10:1	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
D	5:1	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
E	HLA-I Block	→	→									
F	HLA-II- Block	→	→									
G	Spontan Lyse	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	Maximal Lyse	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→

Abbildung 5. Schematische Anordnung einer 96-Well-Spitzbodenplatte wie sie für die Chromfreisetzungsexperimente verwendet wurde.

MESSUNG DER SPEZIFISCHEN ZYTOTOXIZITÄT

Nach der 4stündigen Inkubationszeit wurden 50 µl des Kulturüberstandes aus jedem Well der Testplatte in die Vertiefungen einer 96 Well Luma-Platte transferiert. Die Lumaplatte ist eine spezielle, für die Messung von Chrom entwickelte Mikrotiterplatte, die mit einer festen Szintillationssubstanz gefüllt ist,

die es dann erlaubt, die resultierende Gamma Strahlung im TOP-Counter zu messen. Auch hier wird die Radioaktivität für die Dauer einer Minute gemessen (CPM=Counts per minute). Als Spontanwert diente die Chromabgabe jeder Zielzelle ohne die Zugabe von CTLs (Reihe G, Abbildung) und als Maximalwert diente die Chromabgabe, die durch Triton-X- Behandlung der Zielzellen bewirkt wurde (Reihe H, Abbildung). Aus den experimentell erzielten ^{51}Cr -Freisetzungswerten, den spontanen und maximalen ^{51}Cr -Freisetzungswerten läßt sich nach folgender Formel der Prozentsatz der spezifischen Lyse ermitteln:

$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{Experimentelle } ^{51}\text{Cr} - \text{Freisetzung (CPM)} - \text{Spontane } ^{51}\text{Cr} - \text{Freisetzung (CPM)}}{\text{Maximale } ^{51}\text{Cr} - \text{Freisetzung (CPM)} - \text{Spontane } ^{51}\text{Cr} - \text{Freisetzung (CPM)}}$

MHC-INHIBITIONS ASSAY

Um zu bestimmen ob die spezifische Zytotoxizität der T-Zellen MHC Klasse-I oder MHC-Klasse-II restringiert ist, wurden die autologen DCs und die autologen LCLs 30 Minuten vor Zugabe der CTLs mit 20 µg/ml der jeweiligen monoklonalen Antikörpern gegen Klasse I und Klasse II inkubiert. Dabei bindet der monoklonale Antikörper W6/32 (DAKO) an monomorphe HLA-ABC- Determinanten und inhibiert dabei deren Erkennung und der monoklonale Antikörper CR3/43 (DAKO) bindet an HLA-DR und verhindert damit HLA-II restringierte Erkennung.

IMMUNOPHÄNOTYPISIERUNG DER CTLs MITTELS DIREKTER IMMUNFLUORESZENZ

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression spezifischer T-Zellmarker wurden die CTLs mit verschiedenen Kombinationen von FITC-oder PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern inkubiert und anschließend in der Durchflussszytometrie ausgewertet. Eingesetzt wurden dazu folgende Antikörper: CD-3, CD-8, CD-4, CD-56, CD-16, CD-25, TCRγδ, TCRαβ, CD-2.

STATISTISCHE AUSWERTUNG DER BEOBACHTETEN ERGEBNISSE

BERECHNUNG DER ARITHMETISCHEN MITTELWERTE

Das arithmetische Mittel \bar{x} ist die Summe aller Beobachtungen geteilt durch die Anzahl dieser Beobachtungen und dient zur repräsentativ-nivellierenden Informationsverdichtung für mehrere bis zahlreiche nicht zu heterogener Daten.

$$\bar{x} = \frac{1(x_1 + x_2 + \dots + x_n)}{n} = \frac{\sum x}{n}$$

BERECHNUNG DER STANDARDABWEICHUNG

Die Standardabweichung s ist gleich der positiven Quadratwurzel aus dem Mittelwert der quadrierten Abweichungen:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

EVALUIERUNG DES SIGNIFIKANZNIVEAUS UND BERECHNUNG DER P-WERTE

Das Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$ wurde festgelegt. Alle Werte, die größer als 0,05 waren wurden als statistisch nicht signifikant gewertet, das heißt die Nullhypothese war abzulehnen.

ANGEWENDETER T-TEST

Signifikanzen wurden zur Auswertung der MLR-Assays verwendet. Hierbei kam ein einseitiger, gepaarter T-Test zum Einsatz. Einseitig, da eine vermehrte Stimulation der Lymphozyten aufgrund der Manipulation an den dendritischen Zellen gesichert ist. Gepaart, da sämtliche verglichenen Datenpaare unter den selben Bedingungen am selben Tag durchgeführt wurden.

ERGEBNISSE

ζ-KETTEN BESTIMMUNG BEI HNO-TUMORPATIENTEN

EINLEITUNG

Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs (SCCHN) weisen eine Suppression sowohl der angeborenen, als auch der adaptiven Immunantwort auf. Auffällig ist hierbei, dass auch stark proliferierende Tumoren von einer Vielzahl an T-Zellen (TIL) infiltriert werden, diese jedoch funktionell inaktiv sind. Um eine erfolgreiche Immunantwort generieren zu können, sind mehrere essentielle Interaktionen zwischen der T-Zelle und Tumorzelle notwendig.

Neben Molekülen der Adhäsion und Kostimulation muss die T-Zelle auch Antigene erkennen, die die Tumorzelle über den MHC Komplex präsentiert (Baskar S, et al. 1993). Diese Erkennung erfolgt über den T Zellrezeptor und stellt einen essentiellen Schritt der Tumorabwehr dar. Der T Zellrezeptor besteht aus mehreren transmembranalen Anteilen, wobei die ζ-Kette als wichtige Komponente des T-Zell-Rezeptors an der Weiterleitung von Signalen und damit auch an der Induktion einer antitumoralen Immunantwort beteiligt ist (Bornstein-Sitton et al. 1999)

Die verringerte Expression der ζ-Kette wurde bereits mit einer Immundysfunktion in Tumorpatienten korreliert (Johansson B. et al. 1999). In vitro weisen diese defizienten T-Zellen eine reduzierte Fähigkeit zur Proliferation nach antigenem oder mitogenem Stimulus auf, eine reduzierte zytotoxische Effektorfunktion, sowie eine reduzierte, für die Ausbildung von zytotoxischen T-Zellen wichtige TH1-Antwort (Wang Q. et al 1995, Gastmann BR. et al 1999). In klinischen Untersuchungen konnte ein klarer Zusammenhang zwischen verminderter TCR ζ-Ketten Expression und manifester Tumorprogression beobachtet werden (Cardi G. et al 1997, Sikora J. et al. 2001, Rabinowich H, et al 1996). Auch für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs liegen erste Daten vor, die histologisch eine verminderte Expression der TCR ζ-Kette auf peripheren

Lymphozyten aus dem venösen Blut und damit einen systemischen Immundefekt zeigen (Reichert TE, et al. 2001, Mittrucker HW, et al 1995) Unklar bleibt der direkte Zusammenhang dieses T-Zell-Defektes und dem Rezidiv der Erkrankung, sowie das Ausmaß des Verlustes der Expression der ζ -Kette auf Tumor infiltrierenden T-Zellen im Vergleich zu T Lymphozyten des peripheren Blutes PBL. Wir zeigen, dass die verminderte Expression der ζ -Kette auf den tumorinfiltrierenden Lymphozyten ausgeprägter ist, als auf den Lymphozyten des peripheren Blutes und eine Korrelation zwischen dem Verlust der ζ -Kette und dem klinischen Verlauf der Erkrankung besteht.

VERMINDERTE EXPRESSION DER ζ -KETTE IN T-ZELLEN DES PERIPHEREN BLUTES KORRELIERT MIT DER TUMORGRÖÖE

Um die Expression der ζ -Kette auf den Lymphozyten zu messen, wurde eine Doppelfärbung mit direkt markierten Antikörpern und anschließender Durchflusszytometrie durchgeführt. Die T-Zellen des peripheren Blutes wurden durch die Expression von CD-3 Molekülen an der Zelloberfläche definiert. Wie in Fig. 1 erkennbar, steigt der Verlust der ζ -Kette mit der Größe des Tumors an, wohingegen die Expression des gesamten TCR, gemessen an der Quantität von CD-3 auf der T-Zelle, nahezu konstant bleibt. Die verminderte Expression der ζ -Kette stellt somit einen isolierten Defekt und nicht eine mangelnde Dichte des TCR dar. Es handelt sich um einen systemischen, mit der Progression des Tumors korrelierten T-Zell-Defekt.

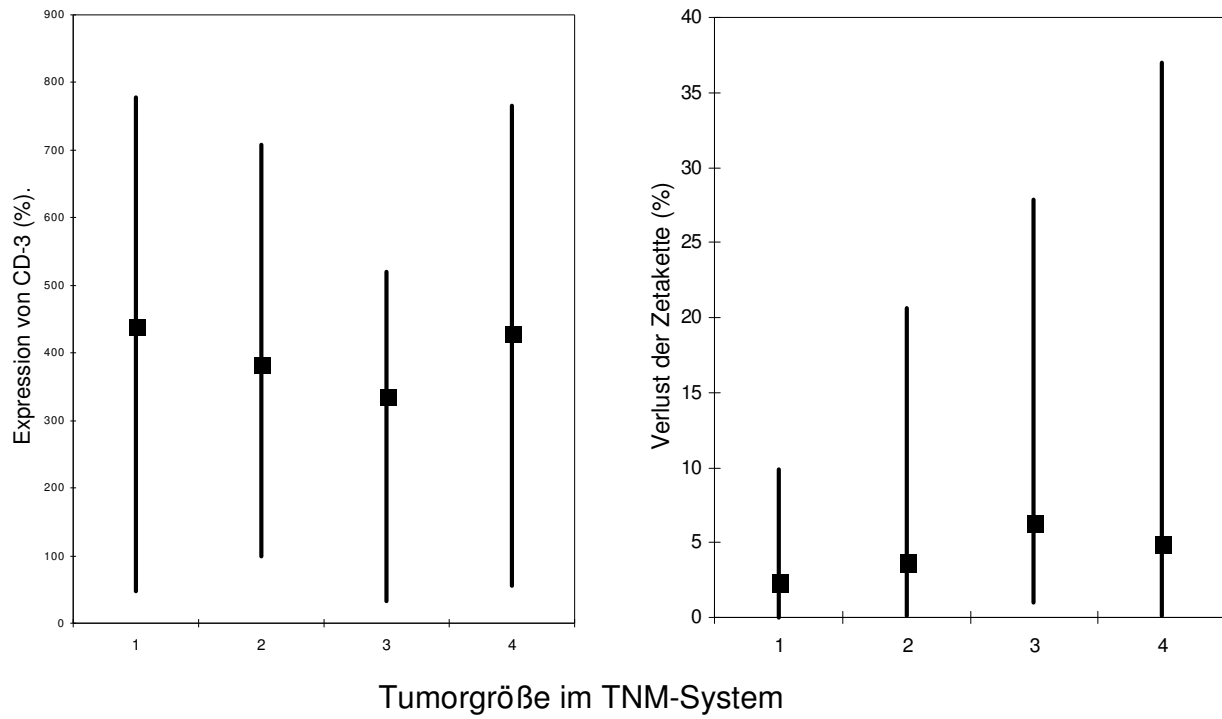


Abbildung 6. Zunehmend verminderte Expression der ζ -Kette auf PBMCs bei zunehmender Tumorgröße (rechte ABB). Im Vergleich zur gleichbleibenden Expression des gesamten TCR gemessen an der Expression von CD3 (linke ABB) lässt sich mit der Verminderung der ζ -Kette ein isolierter Rezeptordefekt nachweisen, der mit der Progression der Tumorgröße korreliert.

VERMINDETE EXPRESSION DER ζ -KETTE AUF T-ZELLEN DES PERIPHEREN BLUTES (PBMC) KORRELIERT MIT DEM STADIUM DER ERKRANKUNG (UICC)

Die reduzierte Expression der ζ -Kette korreliert auch mit dem UICC-Stadium der Erkrankung (Abbildung 7,). Verglichen mit einem gesunden Kontrollprobanden (n=23) konnte eine signifikant ($p < 0.002$) verminderte Expression der ζ -Kette bei SCCHN Patienten gezeigt werden. Patienten im Stadium IV gemäß UICC wiesen demzufolge die niedrigste Expression auf.

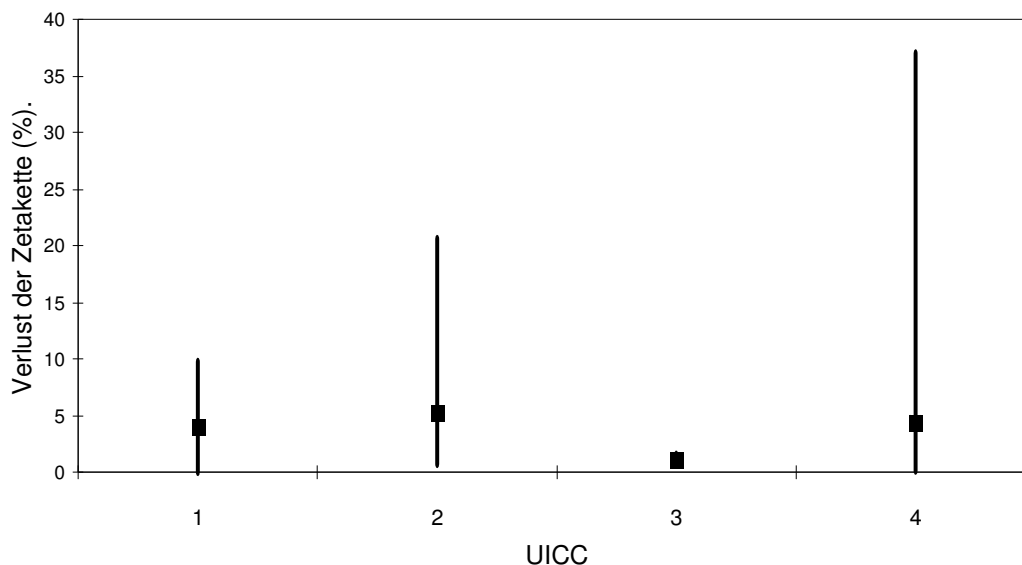


Abbildung 7. Expression der ζ -Kette auf PBMCs in Abhängigkeit des UICC-Stadium

VERMINDETE EXPRESSION DER TCR ζ -KETTE IN TUMORINFILTRIERENDEN LYMPHOZYTEN (TIL)

Bei 11 Patienten (Stadium UICC IV) war es möglich die ζ -Ketten-Expression der Lymphozyten des peripheren Blutes direkt mit der auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten zu vergleichen (Abbildungen 8 und 9,). Dabei zeigte sich, daß bei 9 Patienten die Expression der ζ -Kette in den TILs, d.h. lokoregionär signifikant niedriger war als auf den T-Zellen des peripheren Blutes. Bemerkenswert ist der

Fall (Patient 35), bei dem es sich um ein Tumor Rezidiv handelt, welches eine vielfach höhere Suppression der ζ -Kette in den TILs im Vergleich zu den PBLs aufweist.

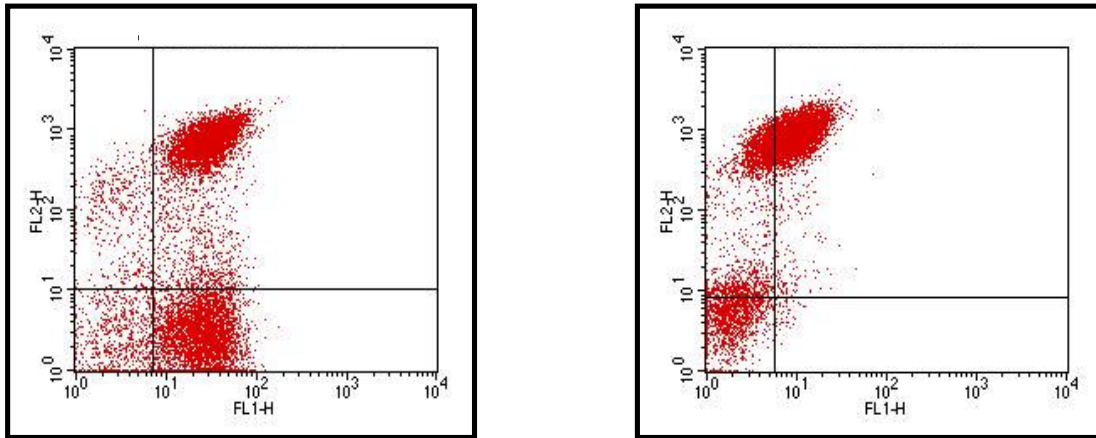


Abbildung 8. Verlust der ζ -Kette in PBMCs (linker Dotplot) ist deutlich geringer als in den TILs (rechter Dotplot) ein und des selben Patienten.

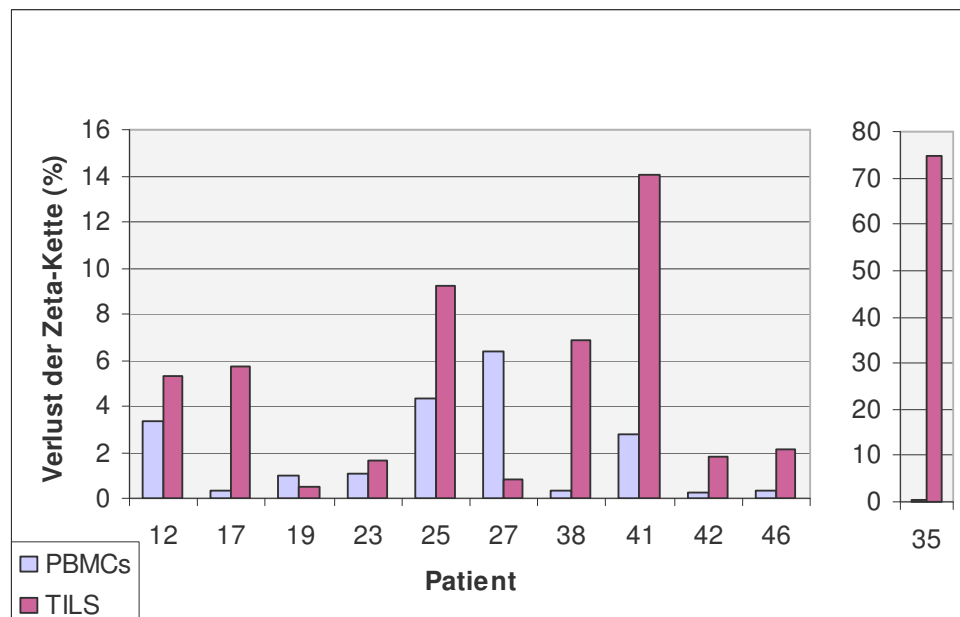


Abbildung 9. Vergleich der ζ -Kettenexpression in PBMCs (linke Säule) versus TILs (rechte Säule) Der enorme Verlust der ζ -Kette bei Patient 35 kann nur mit Hilfe einer eigenen Skala dargestellt werden.

VERMINDERTE EXPRESSION DER ζ -KETTE IN T-ZELLEN DES PERIPHEREN BLUTES (PBMC) KORRELIERT MIT DER REZIDIVERKRANKUNG

Von den 39 Patienten mit primären SCCHN entwickelten 8 Patienten innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes ein lokoregionäres Rezidiv. Diese Patienten wiesen mit 8,2% versus 3,8% Verlust bei Patienten ohne Rezidiv bereits initial zum Zeitpunkt der primären Diagnosestellung eine statistisch signifikante Verminderung der ζ -Kettenexpression auf. Der Unterschied in den Gruppen mit und ohne Rezidiv wurde mit einem unverbundenem T-Test als signifikant ausgewiesen ($p=0,0313$).

Generell ist die Expression der ζ -Kette zum Zeitpunkt des Rezidivs erniedrigt. Bei 8 Patienten, deren Lymphozyten erst im Rezidiv untersucht werden konnten (nicht durch Abbildung dargestellt), lag mit 5,8% zum Zeitpunkt des Rezidivs ebenfalls eine deutlich Verminderung der ζ -Kette vor.

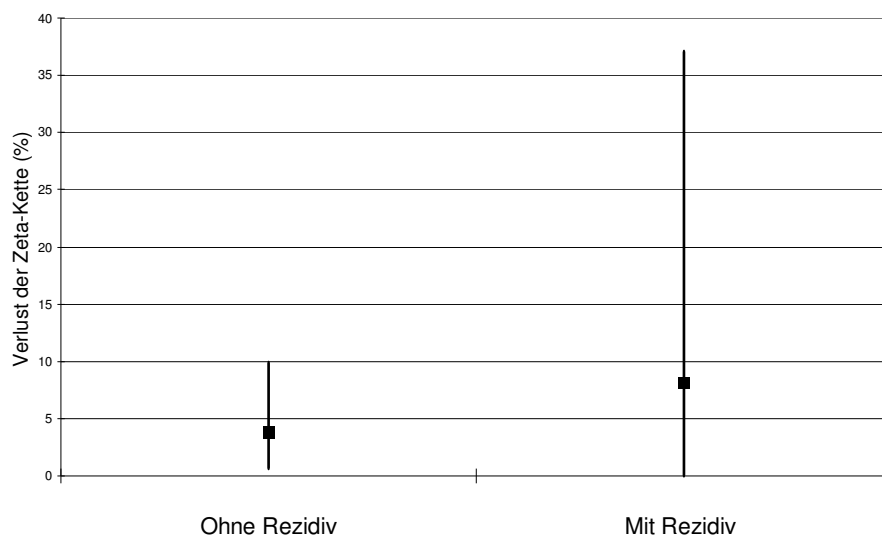


Abbildung 10. Die Expression der ζ -Kette bei primärer Diagnose des SCCHN in Korrelation zum klinischen Verlauf. Die bereits initial verminderte Expression der ζ -Kette ist signifikant mit der Entwicklung eines lokoregionären Rezidivs korreliert

INDUKTION TUMORSPEZIFISCHER ZYTOTOXISCHER T-LYMPHOZYTEN
UNTER VERWENDUNG VON TUMOR-RNA-TRANSFIZIERTEN
DENDRITISCHEN ZELLEN (DCs) ALS STIMULATOREN.

DENDRITISCHE ZELLEN

Dendritische Zellen sind hochpotente antigenpräsentierende Zellen und daher entscheidend für die Ausbildung einer Immunantwort sowohl gegen Pathogene als auch Tumorzellen verantwortlich. Sie besitzen dadurch ein hohes Potenzial für immunologische Behandlungsstrategien gegen Neoplasmen.

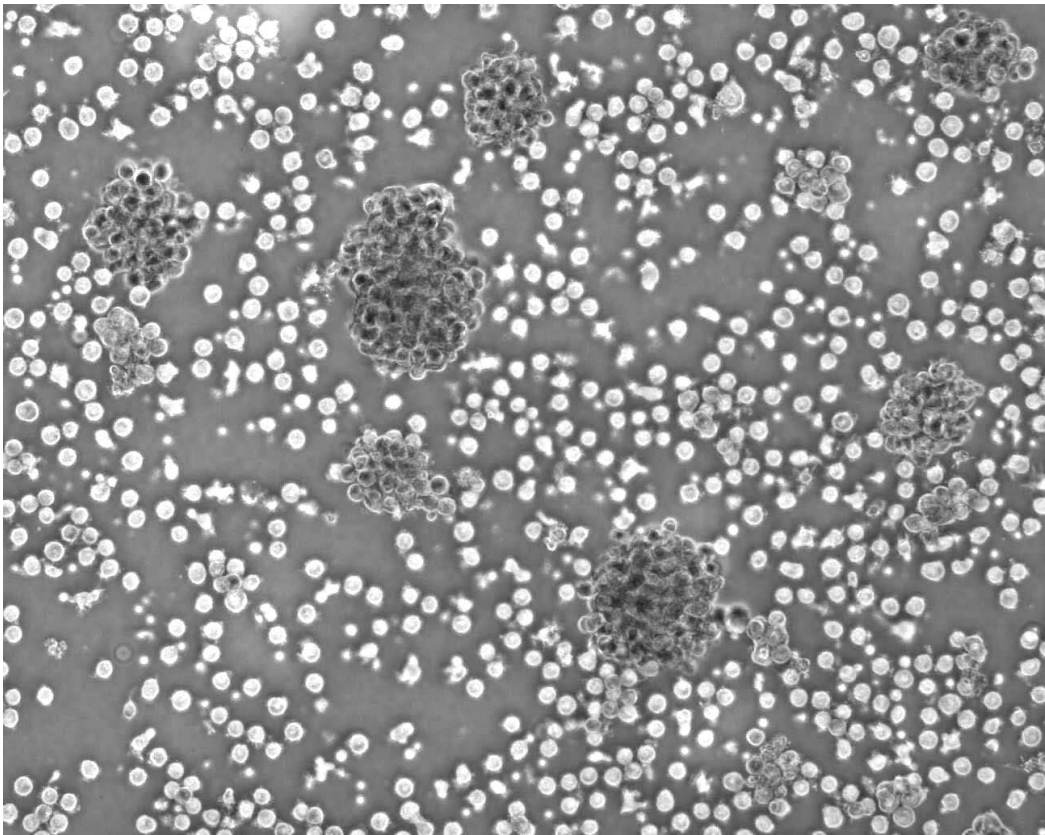


Abbildung 11. Unreife DCs in einer Kulturplatte: Die Zellen aggregieren und bilden sich zu kleineren und größeren Clustern zusammen.

Leukozyten wurden aus dem frischen peripheren Blut oder aus „buffy coats“ isoliert und nach der zweistündigen Adhärenzphase in serumfreien Medium, das mit 500U/ml IL-4, 800 U/ml GM-CSF supplementiert war kultiviert. Nach acht bis

zehn Tagen konnte bereits lichtmikroskopisch der typische Phänotyp unreifer DCs mit großen granulären Zellkörpern, lobulären Nuclei und feinen zytoplasmatischen Ausläufern detektiert werden. Wie in Abbildung 11. deutlich zu sehen, bilden mehrere DCs kleinere bis größere Cluster auf dem Kulturplattenboden, auf dem sie aber nur leicht anhaften. Man bezeichnet diese Zellen daher als semi-adhären, da sie keinen konfluenten Zellrasen bilden und man sie durch auf- und abpipettieren mit einer Pasteurpipette leicht von der Platte spülen kann.

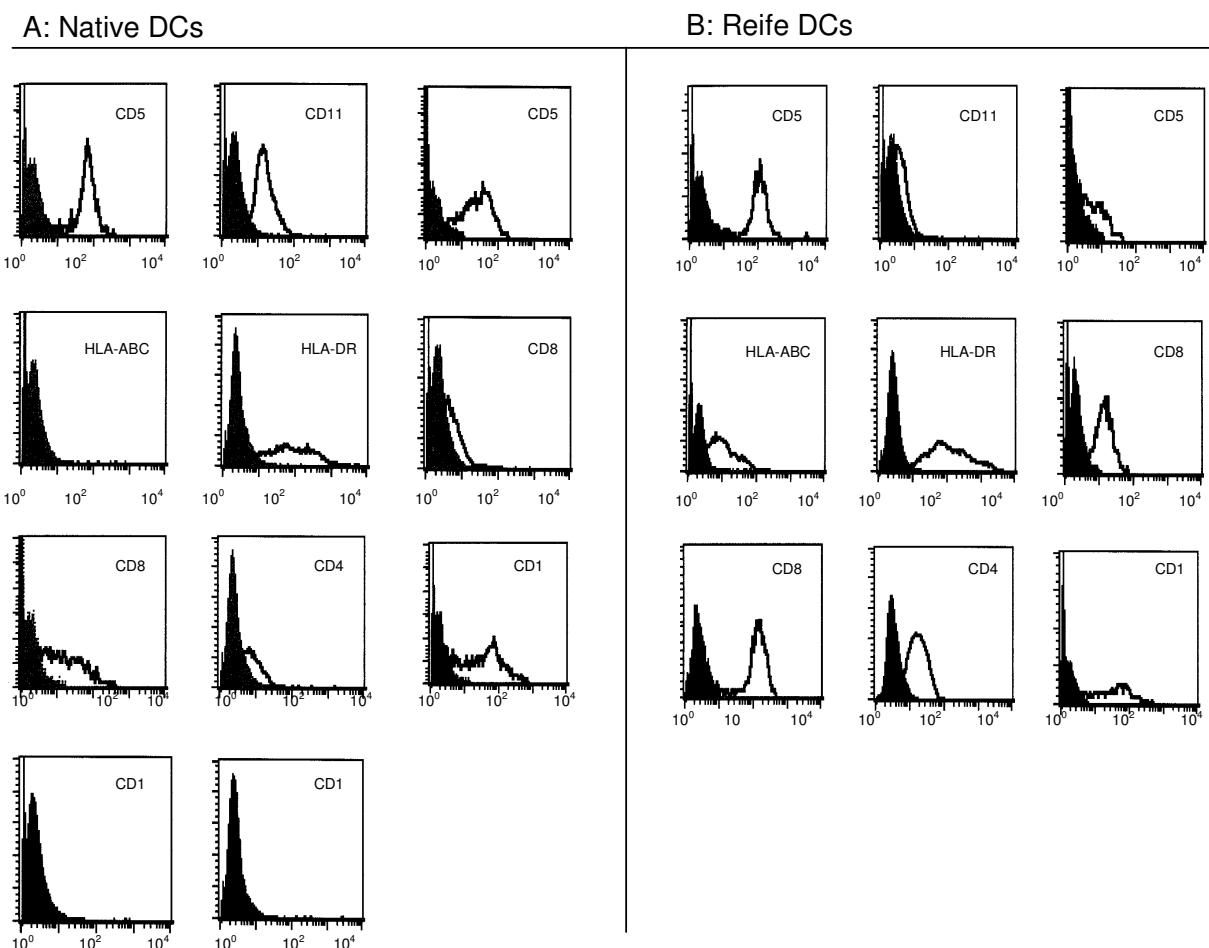


Abbildung 12. zeigt den Vergleich zwischen unreifen und reifen dendritischen Zellen anhand eines charakteristischen Beispiels.

Die noch unreifen DCs wurden dann nachfolgend mit Hilfe der Durchflußzytometrie und Anfärben mit spezifischen, monoklonalen Antikörpern immunphänotypisch charakterisiert. Sie exprimierten weder den Monozyten- und Makrophagenmarker CD14 noch das B-Zell spezifischen Antigen CD19 und

zeigten niedrige bis mittlere Expression der kostimulatorischen und Adhäsionsmoleküle Moleküle CD86, CD40 und CD54 (ICAM-1) sowie geringe bis mittlere Expression der MHC-Moleküle, HLA- ABC und HLA-DR, aber geringe oder gar keine Expression des DC- Markers für reife Zellen CD83. Das Molekül CD1a, wurde in hoher Konzentration auf den unreifen DC exprimiert, ebenso CD11c und das $\alpha 5\beta 3$ -Integrin CD51. Aufgrund dieses Oberflächenprofils wurden die Zellen als unreif charakterisiert.

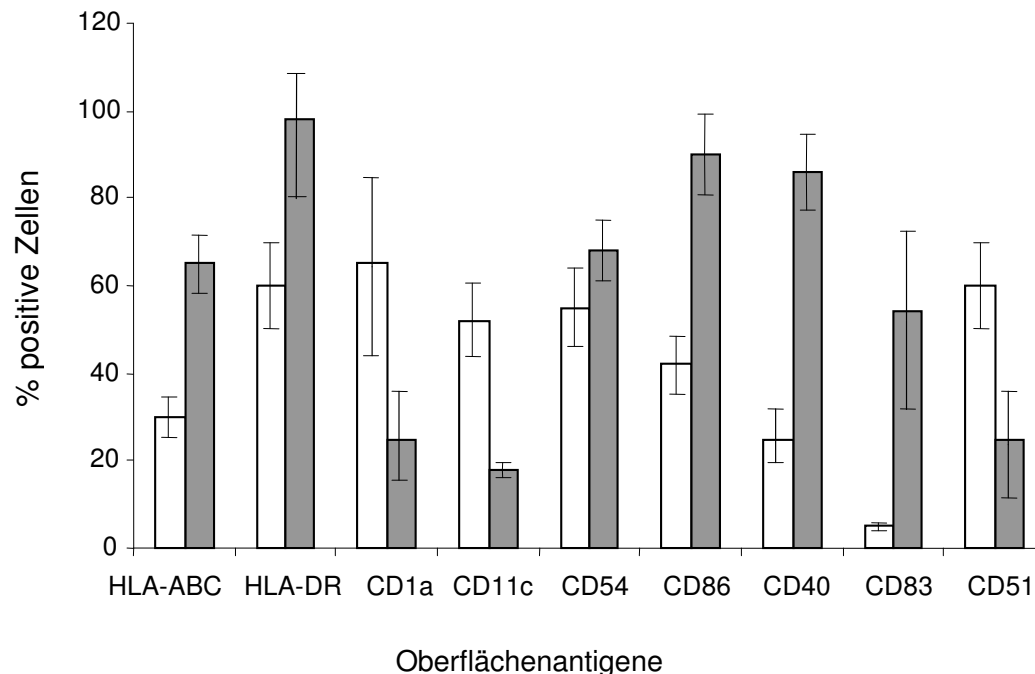


Abbildung 13. Prozentuale Verteilung der Oberflächenmarker auf reifen und unreifen DCs. Die Werte zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von acht repräsentativen Experimenten. Die hellen Balken repräsentieren DCs, die in serumfreien Medium für 10-12 Tage in der Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF kultiviert wurden. Die dunkelgrauen Balken zeigen die gleichen Zellen, die aber drei Tage länger unter Zusatz von TNF- α zur Reife stimuliert wurden.

Die quantitative Auswertung der Zellpopulationen ergab je nach Spender eine Ausbeute von 35 bis 75 %. Die Zugabe von TNF- α (200 U/ml) in das Kulturmedium bewirkte einen Stimulus der die Zellen zu reifen DCs differenzieren ließ. Diese Zellen veränderten sich phänotypisch durch Vergrößerung des Zellkörpers und das Auswachsen längerer zytoplasmatischer Fortsätze. Außerdem konnte stärkeres Anhaften am Kulturplattenboden bemerkt werden. Wiederholung der Immunphänotypisierung zeigte eine Veränderung des Oberflächenprofils dahingehend, das nun die kostimulatorischen Moleküle CD86

und CD40, die MHC-Moleküle HLA-ABC und HLA-DR, das Adhäsionsmolekül ICAM (CD54), sowie CD83 hochreguliert wurden, während es zu einer deutlichen Verminderung in der Expression der Moleküle CD1a, CD11c sowie dem $\alpha 5\beta 3$ -Integrin CD51 kam.

TESTSYSTEME ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FUNKTIONALITÄT VON DCs

UNTERSUCHUNG DER AUFNAHMEKAPAZITÄT VON FITC-DEXTRAN ÜBER DEN MANNOSEREZEPTOR

Nach Beurteilung des immunologischen Profils und der quantitativen Ausbeute der DCs wurde die Funktionalität dieser Zellen in verschiedenen Testsystemen überprüft. Ein wichtiges Experiment um die natürliche Kapazität der DCs zu testen ist Makromoleküle über den Mannoserezeptor aufzunehmen, wurden unreife DCs über verschiedene Zeiträume mit FITC markiertem Dextran inkubiert. Anschließend wurde dann die Aufnahme des Dextrans anhand der MFI (mittleren Fluoreszenzintensität) in der Durchflußzytometrie ermittelt. Dabei wurde der Anstiegswert der MFI ausgehend von der Eigenfluoreszenz der DCs berechnet. DCs sind große granuläre Zellen von unregelmäßiger Gestalt und unterscheiden sich daher oft in der Ausprägung ihrer Eigenfluoreszenz, so daß sich zwischen den einzelnen DC-Populationen unterschiedlicher Spender, auch unterschiedliche Werte für die Eigenfluoreszenz und damit auch in Bezug auf die tatsächlich gemessenen MFI Werte ergeben. Berechnet man aber den Anstieg der MFI gegenüber dieser Eigenfluoreszenz, lassen sich die Werte vieler Experimente miteinander vergleichen. Ein typisches Beispiel für die Aufnahmekapazität unreifer und reifer DCs ist in Abbildung 5 dargestellt. Dabei hat sich gezeigt, dass die MFI im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei 30 Minuten ansteigt, einen Sättigungsgrad erreicht, bis schließlich kein Dextran mehr aufgenommen werden kann. Der Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität wurde gegenüber der Eigenfluoreszenz korrigiert.

Bei unreifen DCs lag die maximale Aufnahmekapazität des FITC-Dextrans bei 120 Minuten und zeigte eine signifikante Abnahme der Aufnahmekapazität bei

180 Minuten. Die gleichen Experimente wurden mit reifen DCs durchgeführt und wie in der Abbildung dargestellt, verlief die Kurve, aufgrund der eingeschränkten Aufnahmekapazität reifer DCs, deutlich flacher als bei den unreifen Zellen und zeigte auch keinen signifikanten Anstieg oder Abstieg der Aufnahmekapazität.

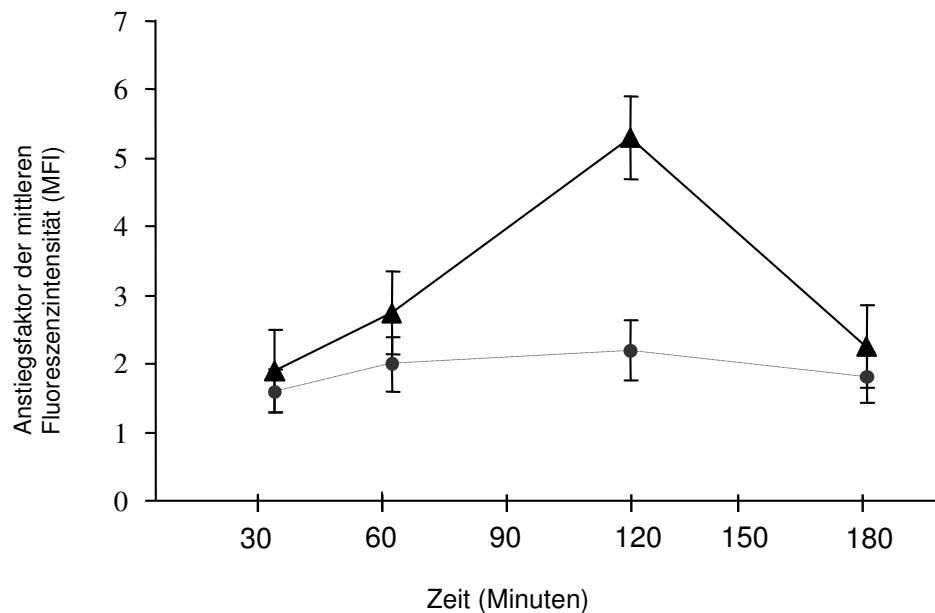


Abbildung 14. Aufnahme durch FITC-Dextran durch unreife DCs (dicke Linie) im Vergleich zu reifen DCs (dünne Linie)

Unreife dendritische Zellen verfügen über eine höhere Kapazität über den Mannoserezeptor FITC-konfiguriertes Dextran aufzunehmen als reife DCs. Die durchgezogene Linie zeigt über einen Zeitraum von 30 bis 180 Minuten die Fähigkeit unreifer DCs das Makromolekül FITC-Dextran aufzunehmen. Die gestrichelte Linie zeigt reife dendritische Zellen und deren eingeschränkte Aufnahmekapazität gegenüber FITC-Dextran.

T-ZELLSTIMULIERUNG DURCH RNA-TRANSFIZIERTE DENDRITISCHE ZELLEN IM ALLOGENEN SYSTEM

Nachdem die dendritischen Zellen als hochpotente Antigenpräsentierende Zellen ausreichend charakterisiert wurden, sollte des weiteren die Funktionalität dieser Zellen getestet werden. Das weiterführende Ziel sollte sein, tumorspezifische zytotoxische T-Lymphozyten zu generieren. Als Ressource für das Tumorantigen

diente die RNA von SCCHN-Tumoren bzw. von der Tumorzelllinie GHD. Diese wurde isoliert und zusammen mit dem kationischen Lipid DOTAP und OPTIMEM mit den unreifen DCs inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Zellen ein zusätzliches Reifesignal in Form von TNF- α zugegeben um eine optimale Stimulationskapazität zu erzielen. Denn nur reife DCs sind in der Lage optimal T-Zellen zu stimulieren, während unreife DCs für die Antigenaufnahme verantwortlich sind.

Um die immunstimulatorische Kapazität von mit Tumor-RNA-transduzierten DCs zu testen wurden gemischte Lymphozyten Reaktions Experimente (MLR= mixed lymphocyte reaction) durchgeführt. Ursprünglich, diente diese Methode zum Nachweis von Gewebeunverträglichkeit. In dem klassischen Test werden gleiche Mengen von bestrahlten Stimulator-Lymphozyten mit unbestrahlten Responder-Lymphozyten inkubiert um eine aussagekräftige Reaktion zu erhalten. Wenn man aber DCs als Stimulatoren verwendet, reichen weniger Zellen aus um die T-Zellen zur Proliferation anzuregen.

Für den allogenen Ansatz wurde aus dem peripheren Blut von HLA-inkompatiblen gesunden Spendern T-Zellen über ein negatives Zellseparationsverfahren isoliert. Dazu wurden die PBMCs mit einer Mischung spezifischer Antikörper (CD11b, CD56, CD36, CD19), die gegen Nicht-T-Zellen gerichtet waren markiert. An diese Antikörper sind magnetische „Beads“ gekoppelt, so dass nach Auftragen der Zellsuspension auf eine mit Stahlkügelchen gefüllte Säule, die an einen Magneten installiert wurde, alle markierten Zellen in der Säule hängen blieben, während die unmarkierte negative Zellfraktion durch die Säule lief und für die weitere experimentelle Vorgehensweise gesammelt wurde. Diese von der Firma Miltenyi entwickelte Methode garantiert eine 98 %ige Reinheit an CD3-positiven T-Zellen und dies konnte auch durch Anfärben mit monoklonalen Antikörpern, die gegen CD3 gerichtet waren, in der Durchflußzytometrie bestätigt werden.

Schließlich wurden variierende Zahlen (10000, 5000, 2000) von bestrahlten DCs, die aus dem Blut von SCCHN Patienten gewonnen wurden mit 1×10^5 dieser hochreinen T-Zellen kokultiviert. Dabei ergaben sich Stimulator zu Responder Ratios von 10:1, 20:1 und 50:1.

Obwohl DCs sich nicht mehr teilende Zellen sind, wurden sie deshalb bestrahlt, weil es sich bei den DC-Kulturen niemals um reine Kulturen handelte und sie immer über einen gewissen Anteil an Lymphozyten verfügten, deren Teilung in der MLR nicht erwünscht waren. Nach sechs Tagen wurde der MLR ^3H -markiertes Thymidin für einen Zeitraum von 18 Stunden zugesetzt. Das radioaktiv markierte Thymidin baut sich nur in die DNA von teilenden Zellen ein. Die emittierende β -Strahlung kann dann nach Ernten der Zellen als cpm (Scintillationsmeßwert pro Minute) gemessen werden und stellt ein Maß für die Proliferationskapazität der Zellen dar. Die Ergebnisse dieser Experimente (n=6) wurden in Abbildung 15. zusammengefasst.

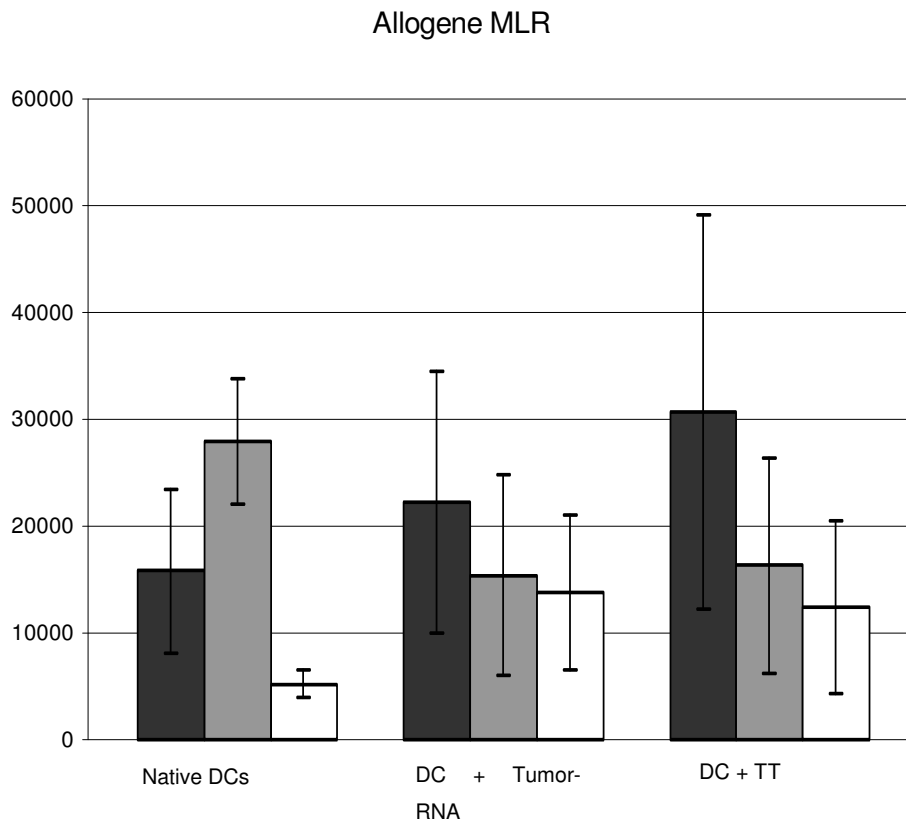


Abbildung 15. Ergebnis der allogenen MLR. Die Balkenfarbe gibt das Verhältnis von Stimulatoren zu T-Zellen an. Schwarz steht für 1 zu 10, grau für 1 zu 20 und weiß für 1 zu 50.

STATISTISCHE BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die sechs durchgeführten allogenen MLRs wurden gemeinsam statistisch bewertet. Zu Bestimmung der Stimulationsfähigkeit unterschiedlicher DCs Populationen wurde ein gepaarter, einseitiger T-Test verwendet. Dabei ergab sich für den Vergleich der Stimulationsfähigkeit der nativen DCs gegen die Stimulationsfähigkeit der transfizierten DCs in der Verdünnung von 1 zu 10 ein signifikanter Unterschied ($p=0,045$). In der Verdünnung 1 zu 20 ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p=0,01$), und in der Verdünnung 1 zu 50 konnte kein signifikanter Unterschied mehr nachgewiesen werden ($p=0,12$).

Somit kann den, mit Tumor-Poly-RNA transfizierten dendritischen Zellen, ein deutlich höheres Stimulationspotential auf allogene Lymphozyten zugeschrieben werden, als den nativen dendritischen Zellen.

PHÄNOTYPISCHE ANALYSE ALLOGENER T-ZELLEN

Ergänzend zu den oben beschriebenen Experimenten, wurde auch der Immunphänotyp der proliferierende Lymphozyten durch Anfärbung mit T-Zellspezifischen Antikörpern in der Durchflusszytometrie bestimmt. Erwartungsgemäß konnte eine Dominanz an CD3- CD4positiven T-Zellen detektiert werden, da insbesondere CD4 positive T-Zellen alle Varianten der MHC-II Moleküle auf den DCs erkennen.

Phänotyp der T-Zellen	Native DCs	Transfizierte DCs	TT+ DCs
CD3/CD4	89% ($\pm 25\%$)	86,4% ($\pm 15\%$)	74,4% ($\pm 16,5\%$)
CD3/CD8	7,2% ($\pm 2,4\%$)	6,6% ($\pm 2,2\%$)	6% ($\pm 3,3\%$)
CD3/CD56	<0,5%	<0,5%	<0,5%

Tabelle 1. Phänotypischer Analyse allogener T-Zellen mit reifen DCs mittels direkter zweifarben Immunfluoreszenz.

LYMPHOZYTENSTIMULIERUNG DURCH DENDRITISCHE ZELLEN IM AUTOLOGEN SYSTEM

Nachdem gezeigt werden konnte, dass mit Tumor-RNA-transfizierte DCs die Proliferation allogener T-Zellen bewirken konnten, sollte als Nächstes demonstriert werden, dass Tumor-RNA-transfizierte DCs von SCCHN-Patienten die Kapazität besitzen, autologe T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Wie im allogenen System muß während der Operation eines SCCHN-Patienten genügend Blut für eine Kultur von dendritischen Zellen abgenommen werden und eine ausreichend große Tumorprobe gewonnen werden um Tumor-Poly-RNA zu gewinnen. Zusätzlich muß drei bis vier Wochen später 20 bis 40 ml Menge Blut entnommen werden, um die zu stimulierenden T-Lymphozyten zu gewinnen. Vor diesem Hintergrund konnten vier verwertbare autologe gemischte Lymphozyten Reaktionen durchgeführt werden.

Die gewonnenen dendritischen Zellen wurden in Durchfluss-zytometrischen Messungen als solche identifiziert und ihr Reinheitsgrad bestimmt. Dabei ergaben sich für den ersten Ansatz 37%, für den zweiten 22%, für den dritten 54% und für den vierten 35% dendritische Zellen. Da in den Ansätzen die Anzahl der absoluten dendritischen Zellen gleich ist, beeinflussen diese verschiedenen Reinheitsgrade das Ergebnis nicht.

Autologe MLR

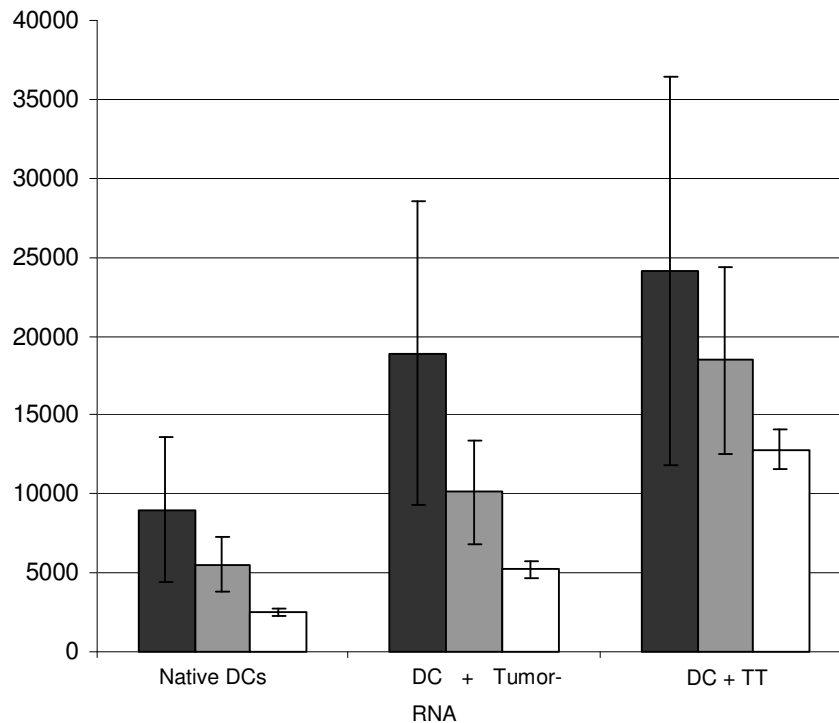


Abbildung 16. Ergebnis der autologen MLR. Die Balkenfarbe gibt das Verhältnis von Stimulatoren zu T-Zellen an. Schwarz steht für 1 zu 10, grau für 1 zu 20 und weiß für 1 zu 50.

STATISTISCHE BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

In der Auswertung wurden alle vier durchgeführten autologen MLR zusammen betrachtet. Auch hier wurde, wie in dem allogenen System, ein einseitiger, gepaarter T-Test verwendet. Dabei ergab sich für den Vergleich der Stimulationsfähigkeit von transfizierten DCs mit untransfizierten DCs in der Verdünnung 1 zu 10 ein hochsignifikantes Ergebnis ($p = 0,025$). In der Verdünnung von 1 zu 20 konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden ($p = 0,068$) und in der Verdünnung von 1 zu 50 eine grenzwertige Signifikanz ($p = 0,049$).

Somit konnte, wie auch im allogenen System, nachgewiesen werden, daß die mit autologer Tumor-Poly-RNA transfizierten dendritischen Zellen, einen besseren Stimulator für die Proliferation von Lymphozyten darstellen als dies nicht transfizierte dendritische Zellen sind. Diese Tatsache bildet das Fundament des nachfolgenden Nachweises der Tumorspezifität der derart stimulierten T-Zellen.

PHÄNOTYPISCHE ANALYSE AUTOLOGER T-ZELLEN

Auch hier wurde, ergänzend zu den oben beschriebenen Experimenten, der Immunphänotyp der proliferierenden Lymphozyten durch Anfärbung mit T-Zellspezifischen Antikörpern in der Durchflusszytometrie bestimmt. Erwartungsgemäß konnte eine Dominanz an CD3- CD4positiven T-Zellen detektiert werden, da insbesondere CD4 positive T-Zellen alle Varianten der MHC-II Moleküle auf den DCs erkennen.

Phänotyp der T-Zellen	Native DCs	Transfizierte DCs	TT+ DCs
CD3/CD4	69,4% (\pm 13,2%)	66,5% (\pm 15%)	72,4% (\pm 18%)
CD3/CD8	19,7% (\pm 8,2%)	20,6% (\pm 7,8%)	8,5% (\pm 2,8%)
CD3/CD56	<0,5%	<0,5%	<0,5%

Tabelle 2. Phänotypischer Analyse allogener T-Zellen mit reifen DCs mittels direkter zweifarben Immunfluoreszenz.

NACHWEIS DER TUMORSPEZIFITÄT DER GENERIERTEN T-ZELLEN

EINFÜHRUNG IN DEN CHROMFREISETZUNGS TEST

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die mit Tumor-RNA transfizierten DCs hohe immunstimulatorische Kapazität aufweisen, sollte als nächstes demonstriert werden, in wie weit diese transfizierten DCs die Fähigkeit besitzen, spezifische, gegen Tumorantigene gerichtete zytotoxische T Lymphozyten zu stimulieren. Daher wurde anhand eines Patientenbeispiels ebenfalls RNA der Tumorzelllinie „GHD“ und reife DCs als Stimulatorzellen verwendet. Die Tumorzelllinie GHD konnte von demselben Patienten dauerhaft kultiviert werden, von dem die folgenden Experimente stammen, so daß eine uneingeschränkte Tumor-RNA-Quelle zur Verfügung stand. Alternativ dazu wurden auch untransfizierte, native autologe und reife DCs zur Stimulation von autologen PBL als Kontrolle verwendet.

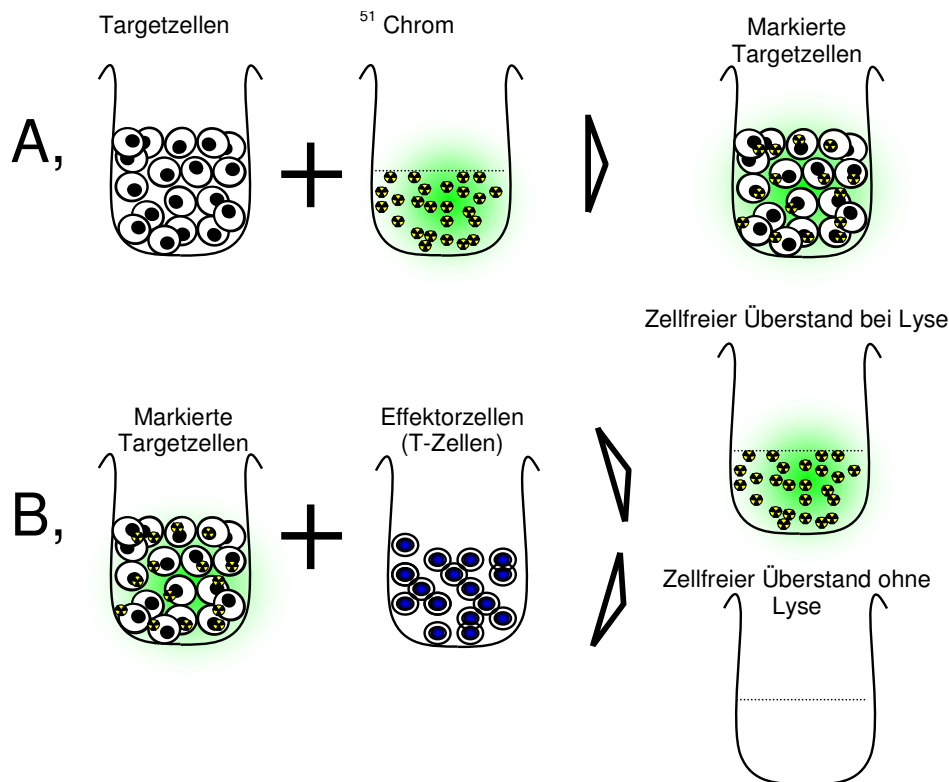


Abbildung 17. Schematische Darstellung des standard Chromfreisetzungstest. In A, ist das Markieren, bei dem die Zielzellen mit $^{51}\text{Chrom}$ -haltigem Medium inkubiert werden, dargestellt. Nach drei Waschschrten befindet sich das $^{51}\text{Chrom}$ nur noch in den somit markierten Zielzellen. Diese werden anschließend (>B,) mit den Effektorzellen inkubiert. Findet eine Lyse statt, so kann das freigesetzte $^{51}\text{Chrom}$ im zellfreien Überstand in einem Gammacounter gemessen werden

Aus frischem autologen Spenderblut isolierte PBL (ggf kryokonserviert unmittelbar vor dem Ansetzen der Kokultur aufgetaute autologe PBL) dienten als Responderzellen. Dabei wurden die Stimulatorzellen diesmal nicht bestrahlt, da die Lymphozyten innerhalb der DC-Population im autologen System keinen Einfluß auf die Stimulationskapazität der DCs hatten. Das Verhältnis der Stimulator zu Responderzellen betrug in der Startkultur 5×10^4 AdV+DCs zu 2×10^6 PBMNCs. Nach zehn Tagen wurde die sich entwickelnde ZTL-Kultur zum ersten Mal mit autologen AdV⁺DCs in einer Ratio von 4:1 (ZTL:DC) und danach noch einmal mit autologen LCLs (4:1) restimuliert wobei am Tag 17 niedrigdosiertes IL-2 (20 U/ml) dem Kulturmedium zugefügt wurde. Der Zeitpunkt und die Menge des zugefügten IL-2 waren entscheidend um das Auswachsen unspezifischer Effektorzellen zu verhindern, die sich zu Beginn in großen Mengen innerhalb der gesamten T-Zellpopulation in der Kultur aufhalten. Zu frühe Gabe von IL-2, dem für die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen wichtigsten Wachstumsfaktor, würde selbst die Proliferation solcher Zellen bewirken, die nur die niederaffine Form des IL-2-Rezeptors exprimieren. Diese Zellen könnten dann das Expandieren der spezifischen T-Zellklone beeinträchtigen. Zur Bestimmung der spezifische Zytotoxizität diente der Standard Chromfreisetzungstest (chrom 51-release Assay) als Methode der Wahl (Abbildung 17)

In diesem Test wurden die Effektorzellen (ZTL) mit variierenden Zellzahlverhältnis von ⁵¹Chrommarkierten Zielzellen (Targets) für vier Stunden inkubiert. Das Verhältnis der Effektoren zu den Targets reichte dabei von 5:1, 10:1, 20:1 bis 40:1. Dendritische Zellen wurden auch als Zielzellen verwendet. Die Zielzellen, die getestet wurden waren: Tumorzelllinie GHD, HLA-mismatched DCs, autologe und allogene LCLs, sowie die T-Zelllinie HSB-2, die aufgrund einer Mutation in den MHC-I-Genen von NK-Zellen erkannt und lysiert wird.

Wie aus den Abbildung 17 und 18 hervorgeht, zeigt sich, dass im Vergleich der beiden CTL- Linien die mit Tumor-RNA transfizierten DCs genauso wie die nativen DCs die Expansion tumorspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten bewirken konnten. Dabei kam es in beiden Fällen weder zur Lyse der autologen

B-LCL Linie, der allogenen LCL-Linie, der allogenen DCs oder der NK-sensitiven Zelllinie HSB, mit dem Hinweis, dass diese tumorspezifische Lyse von MHC restringiert war. Leider reichte der Grad der CTL-Expansion nicht aus, um MHC-Blockierungsexperimente durchzuführen.

ERGEBNISSE DES AUTOGENEN CHROMFREISETZUNGS TESTES

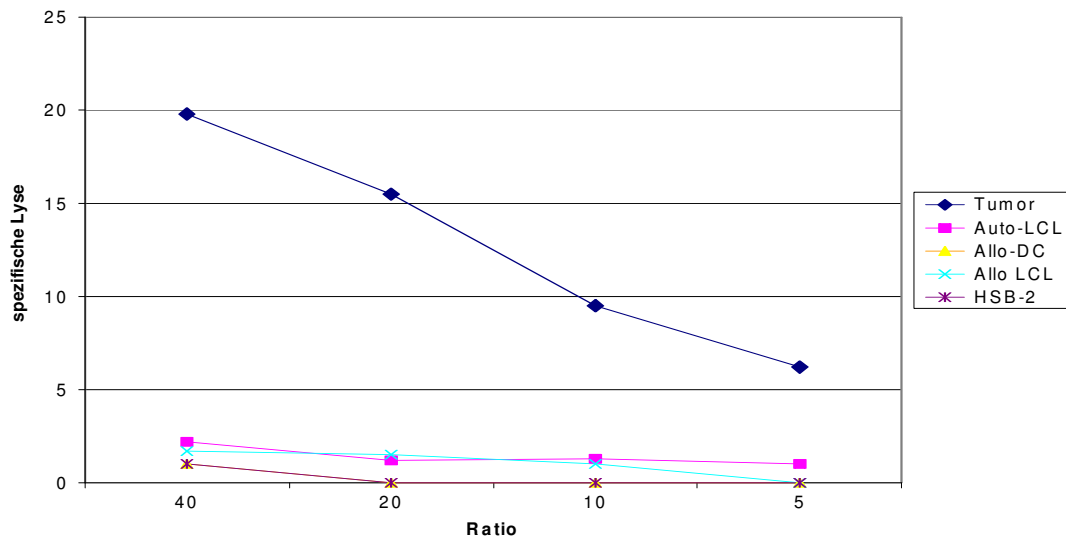


Abbildung 18. Lyseaktivität von T-Zellen die in einer Kokultur mit **transfizierten** dendritischen Zellen gehalten wurden, gegen verschiedene Targets: Tumor entspricht dem autologen Tumor des Patienten, Auto-LCL ist die autologe B-Zelllinie des Patienten, Allo-DC allogene dendritische Zellen eines Spenders, Allo-LCL eine allogene B-Zelllinie und HSB-2 als eine NK-Zellen sensitive Zelllinie. Ratio gibt an, wieviele Effektoren (40, 20, 10 oder 5) auf eine Targetzelle kommt.

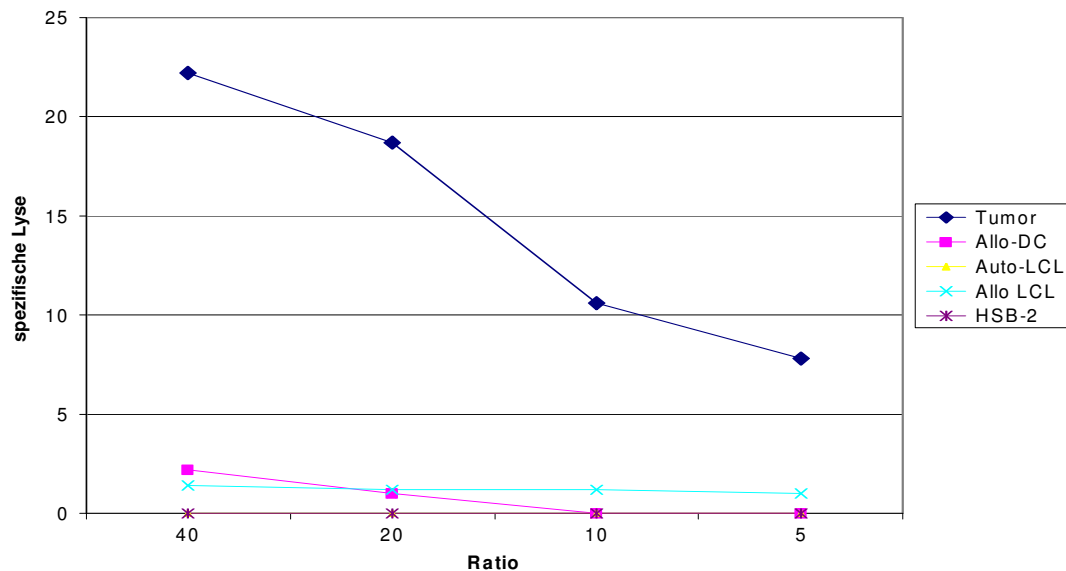


Abbildung 19. Lyseaktivität von T-Zellen die in einer Kokultur mit **nicht transfizierten** dendritischen Zellen gehalten wurden, gegen verschiedene Targets: Tumor entspricht dem autologen Tumor des Patienten, Auto-LCL ist die autologe B-Zelllinie des Patienten, Allo-DC allogene dendritische Zellen eines Spenders, Allo-LCL eine allogene B-Zelllinie und HSB-2 als eine NK-Zellen sensitive Zelllinie

In dieser zweiten Versuchsreihe sollte getestet werden, ob die T-Zellen des Patienten schon vor jedem Kontakt mit dendritischen Zellen, eine Tumorspezifität aufweisen. Wir entschlossen uns deshalb, die zwei bereits im vorhergehenden Versuch verwendeten T-Zellpopulationen (stimuliert mit transfizierten oder nativen dendritischen Zellen) gegen eine dritte zu vergleichen. Als dritte T-Zellpopulation verwendeten wir T-Zellblasten, die wie aus den Lymphozyten des Patienten gewannen.

Erschwert wurde diese Versuchsreihe dadurch, daß der Patient in der Zwischenzeit verstorben war, und kryokonservierte Lymphozyten nur noch in beschränktem Umfang vorhanden waren. Die Tochter des Patienten war jedoch bereit, als Spenderin zu fungieren. Es wurde folgender HLA-Konstellation festgestellt:

Patient	HLA-A: 1- 2	HLA-B: 39- 51
Tochter des Patienten	HLA-A: 1- 24	HLA-B: 39- 27

Es war somit möglich aus dem Blut der Tochter dendritischen Zellen zu gewinnen, die in einem „partial matched“ Versuch verwendet werden konnten.

Da wir durch die vorhandenen Zellzahlen beschränkt waren, verzichteten wir auf einige der Kontrollzelllinien. In dieser Versuchsreihe verwendeten wir als Targetzellen:

- Die Tumorzelllinie des Patienten
- Die „partial matched“ dendritischen Zellen der Tochter des Patienten
- Autologe LCL des Patienten

Bereits in der vorhergehenden Versuchsreihe hatten wir eine Spezifität gegen den Epstein-Barr-Virus sowie eine NK-Zellantwort ausgeschlossen.

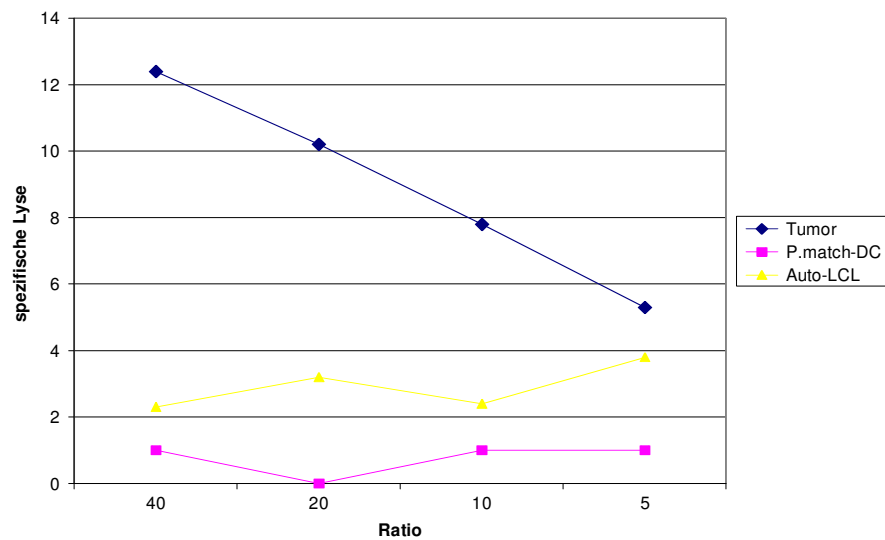


Abbildung 20. Lyseaktivität von T-Zellen die in einer Kokultur mit **transfizierten** dendritischen Zellen gehalten wurden, gegen verschiedenen Targets: Tumor entspricht dem autologen Tumor des Patienten, P-match-DC steht für die DCs der Tochter des Patienten und Auto-LCL ist die autologe B-Zelllinie des Patienten. Ratio bedeutet die Anzahl der Effektoren (40, 20, 10 oder 5) pro Targetzelle.

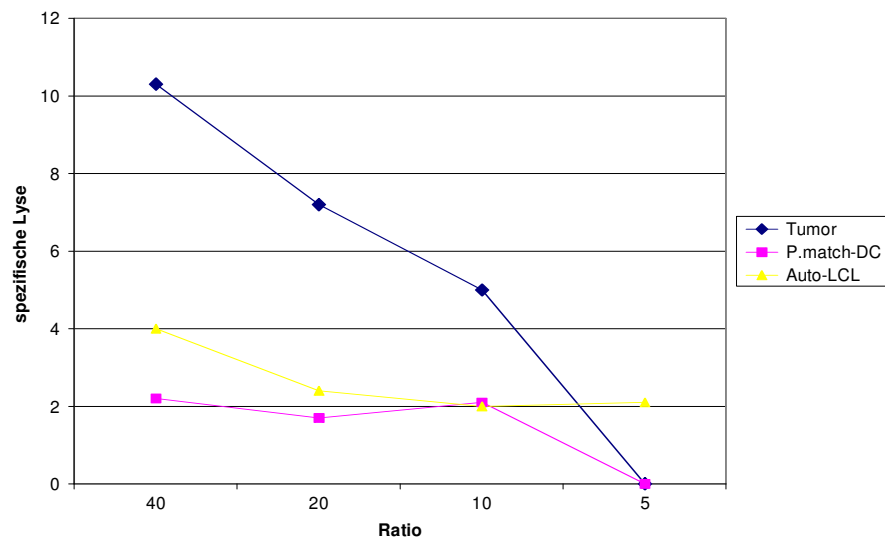


Abbildung 21. Lyseaktivität von CTL die in einer Kokultur mit nicht transfizierten dendritischen Zellen gehalten wurden, gegen verschiedenen Targets: Tumor entspricht dem autologen Tumor des Patienten, P-match-DC steht für die partiell gematchten DCs der Tochter des Patienten und Auto-LCL ist die autologe B-Zelllinie des Patienten.

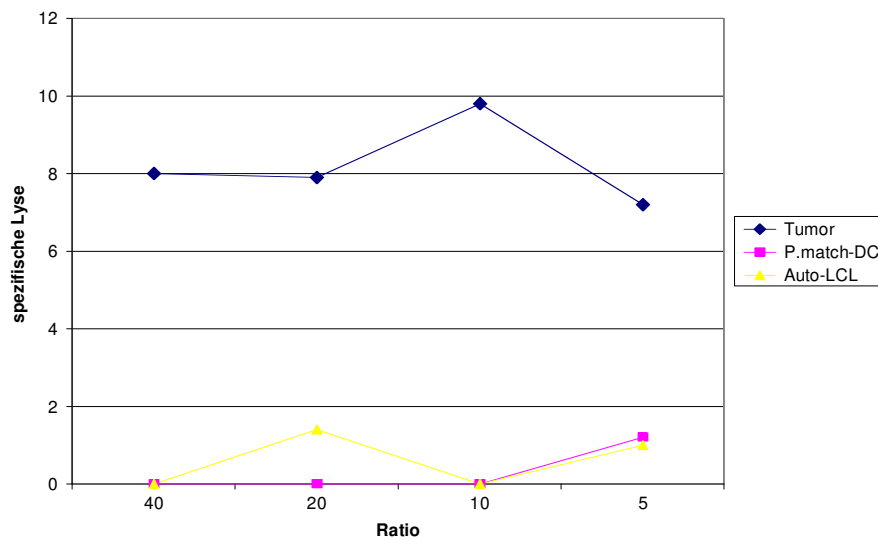


Abbildung 22. Lyseaktivität von Blasten die aus den Lymphozyten des Patienten gewonnen wurden, gegen verschiedenen Targets: Tumor entspricht dem autologen Tumor des Patienten, P-match-DC steht für die partiell gematchten DCs der Tochter des Patienten und Auto-LCL ist die autologe B-Zelllinie des Patienten.

Die erste, autologe Versuchsreihe hatte eine Spezifität der T-Zellen ergeben. Dies war unabhängig davon, ob sie von dendritischen Zellen stimuliert wurden die mit autologer Tumor-Poly-RNA transfiziert wurde oder von nativen dendritischen Zellen stimuliert wurden. Die zweite Versuchsreihe wurde durchgeführt, um zu testen, ob die Spezifität der T-Zellen unabhängig von der Stimulation von dendritischen Zellen ist. Dabei konnten die im autologen Ansatz erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden, d.h. eine spezifische Lyse war unabhängig von der stimulierenden dendritischen Zelle nachweisbar.

Die zum Vergleich eingesetzten T-Zellblasten zeigen ebenso eine spezifische Lyse. Diese ist im Vergleich niedriger und weniger titrierbar, jedoch ebenso eindeutig wie in den Versuchen mit T-Zellen die mit dendritischen Zellen stimuliert wurden.

Somit scheint bestätigt, dass der Patient schon vor den Versuchen einen hohen Prozentsatz an tumorspezifischer T-Zellen hatte. Ein Nachweis der Induktion einer Tumorspezifität durch die von uns gewählte Methode ist daher bei diesem Patienten nicht möglich gewesen. Leider erfordert der Nachweis der Tumorspezifität im autologen System einen ungeheuren Aufwand und

verschiedene zum Teil unbeeinflussbare Kriterien müssen erfüllt sein, so dass wir diesen Nachweis letztlich doch schuldig bleiben müssen.

DISKUSSION

Trotz verschiedener effektiver Behandlungsmethoden des Plattenepithel Karzinoms des Kopf- und Halsbereiches (SCCHN) kann ein Rezidiv nicht immer verhindert werden. Bei Auftreten eines Rezidives sind die Chancen des Patienten auf eine dauerhafte Heilung deutlich vermindert (Dreyfuss et al 1991). Das Fehlen effektiver konventioneller Therapien zur Behandlung metastasierender Tumore auf der einen Seite und die zunehmenden Erkenntnisse der Effektormechanismen des Immunsystems gegen Tumoren auf der anderen Seite haben in den letzten Jahren zu der Entwicklung von Immuntherapien gegen Neoplasien geführt. Viele solide Tumoren, wie Sarkome und Karzinome exprimieren tumorspezifische Antigene, die von spezifischen Effektorzellen des Immunsystems erkannt werden können (Ochsenbein et al. 1998, Gilboa 1999). Dabei spielt die Identifizierung und Charakterisierung dieser tumorassoziierten oder tumorspezifischen Antigene eine wichtige Rolle und stellt gleichzeitig die größte Schwierigkeit dar. Am besten untersucht und charakterisiert sind tumorspezifische Antigene beim malignem Melanom. Bisher sind mehr als 20 verschiedene Melanom Antigene charakterisiert (Souza et al 1998). Die Kenntnis dieser Antigene stellt die Basis für die ex vivo Generierung tumorspezifischer zytotoxischer Effektorzellen dar. Leider sind bei den meisten soliden Tumoren, wie auch dem Karzinom des Kopf- und Halsbereiches (SCCHN) solche definierten Antigene noch nicht ausreichend charakterisiert.

Ein weiteres Problem ist, daß Tumordinfiltrierende Lymphozyten (TIL) mit dem Phänotyp CD-8 positiver zytotoxischer T-Lymphozyten, in Tumorgeweben, sowie im peripheren Blut zahlreicher Tumorpatienten entdeckt worden sind (Mathiassen et al. 2001, Itoh et al 1988, Muul et al 1987), die aber in vivo keine Tumorreaktivität zeigen. Allerdings konnte demonstriert werden, daß diese TILs, ex vivo eine hohe Reaktivität gegenüber dem autologen Tumor entwickeln können. (Nössner et al). Dies konnte u.a. beim Melanom, als auch beim metastasierenden Nierenzellkarzinom gezeigt werden.

Im Falle des metastasierenden SCCHN wurden TILs aus dem Tumorgewebe isoliert und phänotypisch charakterisiert (Mueller et al. 2002). Auch hier handelt es sich um die bereits beschriebenen CD-8 positiven Lymphozyten. Folglich kann auch das Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches als immunogener Tumor betrachtet werden. Dieses Erkenntnis bildet die Grundlage der vorliegenden Arbeit. Dabei sollten zwei unabhängigen Fragestellungen behandelt werden. Im ersten Abschnitt meiner Arbeit bin ich der Frage nachgegangen, welche möglichen Mechanismen dazu führen, daß T-Zellen von SCCHN Patienten immunologisch inaktiv gegenüber dem autologen Tumor sind. Dazu wurde die Expression der CD3-zeta Kette von T-Zellen untersucht.

Der zweite Abschnitt der Arbeit dient der Entwicklung eines Vakzinierungsmodelles, das mit Hilfe von tumorantigenexprimierenden dendritischen Zellen, zur Erzeugung von tumor-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten verwendet werden kann.

Besonders bei Patienten mit fortgeschrittenen Erkrankungen ist die zellvermittelnde Immunität häufig supprimiert. In verschiedenen neoplastischen Erkrankungen, wie z.B. der chronisch myeloischen Leukämie (CML), Hodgkin Lymphom und auch bei RCC (Chen et al 2000, Roskrow et al 1998, Rosmanit et al 2002) konnte die fehlende Expression der CD3-zeta Kette, einer wichtigen Komponente des T-Zell-Rezeptorkomplexes (TCR), detektiert werden. Das Fehlen dieser intrazellulären Domäne führt zu einer Beeinträchtigung der T-Zellfunktion. Hierdurch lässt sich ein Nichterkennen des Tumors von seiten der T-Zelle erklären, da ein intakter TCR für die T-Zell-Aktivierung und die Induktion der antitumoralen zellvermittelten Immunantwort essentiell ist (Mittrucker HW et al 1995, Chitu V et al 2001).

Anlehnend an diese Ergebnisse wurde auch die Expression der Zeta-Kette in SCCHN Patienten untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs gezeigt werden, dass die verminderte Expression der ζ -Kette auf PBMCs direkt mit der Größe des Primärtumors und dem Tumorstadium korreliert: d.h. je fortgeschrittener die Erkrankung desto stärker ist die Expression der ζ -Kette des T-Zell-Rezeptor vermindert. Es handelt sich hierbei um einen isolierten

Defekt der ζ -Kette des TCR, dessen Expression insgesamt quantitativ unverändert bleibt, wie die quantitativ gleich bleibende Dichte von CD3-Molekülen zeigt.

Im Vergleich der ortsständigen tumorinfiltrierenden Lymphozyten mit den Lymphozyten des peripheren Blutes fällt auf, dass die Expression der ζ -Kette auf den peripheren Lymphozyten nur graduell vermindert ist, auf TILs hingegen signifikant.

Die Tumorinduzierte Immunsuppression ist demzufolge nicht nur ein lokales Problem, sondern weist auf eine systemische Inhibition der Immunantwort.

Die verminderte Expression der ζ -Kette konnte bereits initial zum Zeitpunkt der Diagnosestellung gemessen werden.

Im Follow-up zeigte sich, dass Patienten mit einem initial stärkeren Verlust der ζ -Kette bei Erstdiagnose ein statistisch signifikant höheres Risiko aufweisen, an einem Tumorrezidiv zu erkranken. Ebenso fällt auf, dass auch Patienten, die erst zum Zeitpunkt des eingetretenen Rezidives gemessen werden konnten, bei denen folglich keine Ausgangswerte vorlagen, eine auffällig reduzierte Expression der ζ -Kette aufwiesen.

Meine Ergebnisse bestätigen die bislang bekannten Daten aus der Literatur, die zeigen, dass der Verlust der ζ -Ketten Expression in T-Zellen des peripheren Blutes mit dem Fortschritt der Erkrankung korrelieren. Einige Autoren verbinden diesen Herabregulation der ζ -Kette in T-Zellen des Tumors oder des peripheren Blutes in retrospektiven Analysen auch mit einer schlechten Prognose für die SCCHN-Patienten (Reichert TE et al 1998).

Hierbei konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der verminderten Expression der ζ -Kette und dem Tumorstadium, als auch einem verkürzten Überleben festgestellt werden (Reichert TE et al 1998). In einer weiteren Arbeit wurde die ζ -Kette durchflusszytometrisch auf PBMCs von Patienten in einem posttherapeutischen tumorfreien Intervall quantifiziert. Es zeigte sich, dass Patienten ohne aktuell bestehende Tumorerkrankung nach der Behandlung eines Tumorrezidivs bzw. eines zweiten Primärtumors ebenfalls eine sehr niedrige Expression der ζ -Kette aufwiesen (Kuss I. et al 1999). Dies deutet auf einen

persistierenden systemischen T-Zell-Defekt hin, der auch nach erfolgreicher Tumorresektion bestehen bleibt und als potentieller Risikofaktor gelten muss.

Der Verlust der ζ -Kette ist nicht nur auf T-Zellen beschränkt, sondern tritt darüber hinaus auch bei NK Zellen (CD3-/CD16+/ CD56+) auf, hier allerdings im Bereich des FCyRIII Rezeptor. Dies bedeutet, dass in SCCHN-Patienten beide Immuneffektorpopulationen, die eine Immunantwort ausführen könnten, nämlich T- und NK-Zellen, eine verringerte Expression der ζ -Kette der jeweiligen Rezeptoren aufweisen und damit nicht mehr in der Lage sind eine regelrechte antitumorale Immunantwort zu induzieren.

Welcher Mechanismus die Defekte der ζ -Kette induziert ist Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. So wurde eine erhöhte spontane Apoptoserate dieser Zellen ex vivo bereits beschrieben worden (Chen et al. 2000 Kuss I. et al 1999). Es wird vermutet, dass es über eine Tumor-induzierte DNA Fragmentierung in den tumorinfiltrierenden, aber auch im peripheren Blut zirkulierenden T- und NK-Zellen zur Apoptose kommt (Gastman BR et al 2000, Rabinowich H et al 1998)

Ein möglicher Ansatz zur Therapie der ζ -Ketten – Dysregulation des TCR könnten verschiedene biologische Therapien sein. Hierzu liegen die ersten Daten vor. So konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass sich dieser TCR Defekt nach Therapie mit Interleukin 2 (IL2) komplett normalisieren ließ (Rabinowich H et al 1996). Diesen Daten widerspricht, dass andere Arbeitsgruppen hier kaum eine Beeinflussung durch in vivo oder ex vivo appliziertes IL 2 beobachten konnten (Farace F et al 1994). Außerdem hat Chen et al gezeigt, dass durch lösliche anti-CD3-Antikörper (OKT-3) es zu einer Hochregulierung der Zetachain kam (Chen et al 2000).

Die hier beschriebenen Ergebnisse könnten für eine immuntherapeutische Behandlung von Tumoren von Bedeutung sein. Sollte die verminderte Expression der ζ -Kette der TCR eine Folge einer tumorinduzierten Immunsuppression sein, dann könnte eine derartige Analyse als Biomarker herangezogen werden, um nicht nur das Ausmaß der Immundysfunktion zu untersuchen, sondern auch, um einen Prognosemarker, sowie einen Parameter hinsichtlich des Ansprechens auf eine Immuntherapie zu erhalten.

Wie bereits erwähnt, sollte im zweiten Teil meiner Arbeit ein Vakzinierungsprotokoll entwickelt werden zur *ex vivo* Stimulierung Tumorspezifischer CTL als potentiell Therapiemodell zur Behandlung von Patienten mit metastasierenden SCCHN.

Zur Stimulation spezifischer T-Zellen wurden dendritischen Zelle (DC) gewählt.

DCs sind spezialisierte antigenpräsentierende Zellen und verfügen über die Kapazität fremdes Antigen in großen Mengen aufzunehmen und zu verarbeiten. Darüber hinaus sind sie in der Lage diese Antigene naiven oder ruhenden T-Zellen *in vitro* und *in vivo* zu präsentieren. Diese APCs exprimieren große Mengen an MHC- Klasse I und II Molekülen und Adhäsionsmolekülen, sowie eine beträchtliche Anzahl der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40, welche essentiell für die T-Zellaktivierung sind.

In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, daß DCs, die mit spezifischen (Bell *et al* 1999, Banchereau *et al.* 1998).

Zudem haben *In vitro* Studien deutlich demonstrieren können, dass DCs, die entweder genetisch modifiziert wurden, um spezifische Antigene zu exprimieren (Brossart *et al.* 1997, Song *et al.* 1997), mit Peptiden oder mit Tumorantigenen (Ashley *et al.* 1997, Boczkowski *et al.* 1998, Nair *et al.* 1998) beladen oder mit tumorspezifischer RNA (Nair *et al.* 1998, Su *et al.* 2001) gepulst wurden, in der Lage waren hoch effizient antigenspezifische CTL-Antworten hervorzurufen. Diese Erkenntnisse wurden gestützt durch experimentelle Ergebnisse von Studien an Tiermodellen (Zitvogel *et al.* 1996), sowie erste klinische Studien (Nestlé *et al.* 1998, Murphy *et al.* 1996, Tjoa *et al.* 1998, Hsu *et al.* 1996) die die Hypothese unterstützen, dass Individuen, die mit Tumorpeptid-beladenen DCs vakziniert wurden, eine tumorspezifische humorale und zelluläre Antwort hervorrufen konnten. Dies führte zum Rückgang der Tumorlast und dem Aufbau einer schützenden Immunität gegenüber neuem Tumorwachstum *in vivo*.

Da man bisher keine definierten Antigene bei SCCHN kennt, sollte die RNA einer Zelllinie, die von einem Patienten mit fortgeschrittenem, metastasierenden Larynxkarzinom etabliert werden konnte, als Quelle für tumorassoziierte Antigene (TAA) dienen. Zum Zeitpunkt der Experiment konnte durch das Überleben des Patienten eine Versorgung mit frischen, peripheren Lymphozyten gewährleistet werden. So daß die Etablierung eines autologen Systems für eine kurze Zeit

möglich war. Der Vorteil von RNA Transfektion gegenüber der Beladung mit Tumorlysat oder Tumorpeptiden liegt darin, daß DCs die RNA direkt aufnehmen können, diese kann im Zytoplasma direkt in Protein translatiert werden und dann über den MHC Klasse I und II präsentiert werden. Dadurch kann das gesamte Spektrum an Tumorantigenen von einer antigenpräsentierenden Zelle abgedeckt und den T-Zellen präsentiert werden. Der Vorteil liegt auch in der Stimulation von sowohl CD-4 als auch CD-8 positiven T-Zellen, denn die Interaktion beider Subtypen ist für das Zustandekommen einer effektiven Immunantwort wichtig (Ridell et al. 1999, Regn S. 2002). Im Vergleich zur Peptidbeladung, bei der spezifische MHC-Klasse-I Epitope bekannt sein müssen, um Peptide definierte Länge und Sequenz binden zu können, werden hier nur monoklonale CD8-positive T-Zellen stimuliert und folglich kann es nur zu einer eingeschränkten Immunantwort kommen. Durch die RNA steht ein uneingeschränkter Pool an Antigen zur Verfügung, da aus nur geringen Mengen von Tumormaterial, sogar einzelnen Zellen, mit Hilfe der RT-PCR beliebige Mengen an RNA amplifiziert werden können. Damit hat diese Methode auch einen entscheidenden Vorteil gegenüber dem Einsatz von Tumorlysaten, da man hier auf bestimmte Mengen des Tumors angewiesen ist und diese Mengen nicht immer zur Verfügung stehen. Der Tumor selber ist also der limitierende Faktor in diesem System.

Zur Überprüfung der Effektivität RNA-transfizierter DCs als Stimulatoren von T-Zellen wurden allogene und autologe gemischte Lymphozytenreaktionen (MLR) durchgeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse konnten zeigen, daß mit autologer Tumor-Poly-RNA transfinzierte DCs, unter Verwendung des kationischen Lipids (Dotap) als Transfektionsreagenz, in der Lage waren die Proliferation allogener sowie autologer T-Zellen signifikant besser zu stimulieren, als nicht-transfinzierte DCs.

Nach dem gezeigt werden konnte, dass die RNA-transfinzierten DCs immunstimulatorische Kapazität zeigen, wurde unter Verwendung des bereits erwähnten Patientenmaterials, die Generierung einer autologen tumorspezifischen CTL-Linie durchgeführt. Parallel dazu wurden nicht-transfinzierte DCs ebenfalls als Stimulatoren von autologen PBL des gleichen

Patienten als negative Kontrolle verwendet. Die daraus resultierenden Ergebnisse waren in zweierlei Hinsicht überraschend.

Zum einen konnte eine hohe Spezifität gegenüber der autologen Tumorzelllinie detektiert werden mit keinerlei Reaktivität gegenüber anderen autologen oder nicht- HLA kompatiblen Zielzellen. Dadurch wurde eine Tumorspezifität postuliert. Zum anderen jedoch zeigte auch die Kontroll CTL-Linie die gleiche Spezifität, obwohl diese Linie nur mit autologen nativen, somit unbeladenen DCs stimuliert wurde.

Aufgrund der hohen Tumorlast des Patienten läßt sich daher vermuten, daß er über eine hohe Anzahl von Tumorspezifischen Gedächtnis-T-Zellen in seinem peripheren Blut verfügte, die aber durch die Tumorescapemechanismen nicht wirksam werden konnten. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Melanom Patienten gemacht (Zu et al, 1995).

So ist in allen Versuchen eine Tumorspezifität bewiesen worden, dennoch überrascht das Ergebnis insofern, als dendritischen Zellen, die ohne jemals mit autologer Tumor-Poly-RNA in Verbindung zu kommen, ebenso wie mit autologer Tumor-Poly-RNA transfizierte dendritischen Zellen, in der Lage sind eine tumorspezifische T-Zelle zu stimulieren. Dieses war das Ergebnis nach der ersten Versuchsreihe. Da der Patient inzwischen verstorben war, konnten seine Tochter die bezüglich der HLA-Typisierung passend war, als Spenderin von dendritischen Zellen gewonnen werden. Diese wurden als Stimulatoren von DCs des Patienten verwendet. In diesem zweiten Ansatz wurde das zuvor erhalten Ergebnis bestätigt: Durch DCs stimulierte T-Zellen weisen ein hohes Maß an Tumorspezifität auf, gleich ob die DCs zuvor mit autologer Tumor-RNA transfiziert wurden oder nativ und unbeladen waren. Dies ließ sich im autologen wie im allogenen System demonstrieren.

Da beide zuvor genannten Populationen von dendritischen Zellen dieselben Ergebnisse hervorbrachten wie der rein autologe Versuch, steht die Verwertbarkeit des Ansatzes außer Frage. In einem dritten Ansatz verwendeten wir T-Zellen des Patienten die unter der Verwendung von Convalin A zu T-Zellblasten gewandelt wurden, als Effektoren gegen die Tumorzelle. Es galt mit diesem Ansatz zu klären ob die dendritischen Zellen nötig sind, um die von uns beobachtet Tumorspezifität zu erlangen, oder ob die T-Zellen des Patienten an

sich und schon *in vivo* einen hohen Prozentsatz an tumorspezifischen Anteilen hatten. Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnte auch im Ansatz der autologen T-Zellblasten gegen die autologe Tumorzelle eine spezifische Lyse nachgewiesen werden. Damit gilt als bewiesen, dass der Patient in seiner T-Zellpopulation einen großen Anteil an tumorspezifischen T-Zellen hatte. Diese spezifische T-Zellpopulation wurde einerseits durch die DCs, gleich ob transfiziert oder nicht, oder das Convalin A stimuliert und konnte eine signifikante Immunantwort gegen den Tumor etablieren.

Dies deckt sich zum Teil mit der Anamnese der Patienten, der nach einem ausgedehnten Tumorbefall des Larynx eine Larynektomie mit beidseitiger Neckdissection und anschließender Radiotherapie erfuhr. Nach dieser Behandlung war der Patient annähernd fünf Jahre tumorfrei bis er dann an einem Lungentumor verstarb. Es ist leider nicht gesichert, ob es sich bei dem Lungentumor um ein Zweitkarzinom handelt oder ob es sich um eine Metastase des eigentlichen Larynxkarzinoms handelt.

Durch die molekulare Charakterisierung tumorspezifischer Antigene eröffnet sich die Möglichkeit zur Entwicklung spezifischer und effektiverer Vakzinierungsstrategien für Patienten mit metastasierenden Tumoren. Klinische Studien, bei denen Immunisierungen mit Tumorpeptiden durchgeführt wurden, haben gezeigt, daß es zur Proliferation von tumorreaktiven T-Zellen kam. Tumorspezifische Antigene können, je nach verwendeter Vakzinierungsmethode, unterschiedlich starke Immunantworten bewirken (Ramarathnam et al., 1995; Rosato et al. 1997; Brandle et al. 1998) und sind nicht immer in allen Patienten mit einer Tumorart exprimiert. Eine, auf jeden Patienten individualisierte Immuntherapie wie Vakzinierung mit dendritischen Zellen, könnte dieses Problem lösen. Signifikante klinische Immunantworten wurden in verschiedenen Vorläuferstudien beobachtet. Besonders hervorzuheben sind (i,) die Pionierstudie basierend auf einer Vakzinierung mit DCs aus dem peripheren Blut die mit Lymphom-Idiotypen beladen wurde (F.J.Hsu et al 1996) (ii,) die Verwendung von APC die aus einer Monozytenkultur unter der Zugabe von GM-CSF generiert und mit Peptiden gepulst wurden (B.Mukherji et al 1995), sowie (iii,) Injektion von DCs

die aus Monocyten gewonnen wurden und mit Melanompeptiden beladen wurden (F.O. Nestle et al 1998, B.Thurner et al 1999, M.L.Salgaller et al 1998).

Trotz der in dieser Arbeit nachgewiesenen, *in vivo* bestehende Tumorspezifität, verstarb der Patient an seinem Tumorleiden. Die gleiche Beobachtung wurde im Falle des metastasierenden, malignen Melanoms gemacht (Anichini A. et al, 1999) und deckt sich mit den Ergebnissen des ersten Teiles dieser Arbeit: Durch den signifikant höheren Verlust der ζ -Kette in den TILs kommt es zu Ignorierung im Tumor selbst, wogegen die peripheren T-Zellen einen intakten TCR-Komplex aufweisen und somit zu einer Immunantwort fähig wären.

Ein somit wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist die Erkenntnis, daß das Erzeugen oder Nachweisen einer Tumorspezifität nur der erste Schritt einer zukünftigen Immuntherapie sein kann. Viel wichtiger und schwieriger wird die Frage wie die Escape Mechanismen des Tumors überwunden werden können. Die Vorstellung das das Immunsystem dabei zwischen „fremd“ und „selbst“ unterscheidet, scheint für dieses Problem keine rechte Lösung zu bieten. Hilfreicher sind Ansätze in denen sogenannte „Dangersignals“ zu einer Immunantwort benötigt werden. (Matzinger P. 2002) Demnach unterscheidet das Immunsystem nicht zwischen „fremd“ und „selbst“ sondern zwischen „gefährlich“ und „ungefährlich“. Die in, im Rahmen dieser Arbeit, vorgenommenen Manipulationen an den DCs, oder die Zugabe des Mitogens Convalin A können solche „Dangersignals“ darstellen und haben deshalb zu einer spezifischen, antitumoralen Immunantwort geführt.

ZUSAMMENFASSUNG

ζ-KETTEN EXPRESSION BEI PATIENTEN MIT SCCHN

Hintergrund: Die ζ-Kette ist als wichtiger Bestandteil des T-Zellrezeptors (TCR) an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt und nimmt eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen und der konsekutiven Induktion der zellulären Immunantwort ein. Die Expression der ζ-Kette des TCR wurde vergleichend in Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) und zusätzlich in den Tumordinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) identifiziert und mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung korreliert.

Methode: Es wurden TIL und PBL von 47 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches untersucht. Die Expression der ζ-Kette und CD3 wurde mittels Doppelfärbung am Durchflusszytometer quantifiziert. Hierzu wurde eine intrazelluläre Färbung mit einer Oberflächenfärbung kombiniert.

Ergebnisse: Im Vergleich zu Normalspendern (n=23) ist die Expression der ζ-Kette bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (n=47) signifikant reduziert ($p < 0.002$), und zwar um so stärker, je fortgeschrittener das Tumorstadium war.

Bei 11 Patienten wurde die Expression der ζ-Kette auf den Lymphozyten des peripheren Blutes direkt mit der auf den tumordinfiltrierenden Lymphozyten verglichen. Unabhängig vom Tumorstadium ist der Verlust der ζ-Kette in Lymphozyten die aus dem Tumor selbst gewonnen wurden, wesentlich ausgeprägter als in den Lymphozyten des peripheren Blutes.

Der Verlust der ζ-Kette des TCR korreliert auch mit der Progression der Erkrankung, d.h. die Patienten, die ein Rezidiv entwickelten, hatten bereits bei der Primärdiagnose statistisch signifikant erniedrigte Werte der ζ-Kette im Vergleich zum Ursprungswert geheilten Patienten.

Schlussfolgerung: Der Verlust der ζ-Kette dokumentiert einen systemischen Immundefekt beim Kopf-Hals-Karzinom, der auch bereits bei frühen Stadien der Erkrankung vorhanden sein kann. Neben der Therapie der lokoregionären Erkrankung sollten daher zukünftige therapeutische Maßnahmen zur Anwendung kommen, die eine Stärkung der systemischen Immunabwehr induzieren.

DENDRITISCHE ZELLEN ALS STIMULATOREN FÜR T-ZELLEN IN VITRO

Hintergrund: Dendritische Zellen (=DCs) die mit spezifischen Antigenen in Form von Proteinen, Peptiden oder RNA beladen werden können sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ Tumor- und Virus-spezifische ZTL in vitro und *in vivo* stimulieren. Zur Erstellung eines potentiellen Therapiemodells zur Behandlung von Patienten mit SCCHN verwendeten wir deshalb mit autologer Tumor-RNA transfizierte DCs zur Stimulation von T-Zellen in vitro.

Methoden: Zum Nachweis der Stimulationsfähigkeit von mit autologer Tumor-RNA transfizierten DCs wurden sechs allogene und vier autologe gemischte Lymphozyten Reaktions Experimente (=MLR) durchgeführt. Durch Chromfreisetzungssassays im autologen System wurde die Tumorspezifität der stimulierten T-Zellen nachgewiesen. Der Nachweis der bereits bestehenden Tumorspezifität wurde mit einer Blastenlinie geführt.

Ergebnisse: Die allogenen MLRs ergaben je nach Verdünnung ($p=0,045$ für 1:10, $=0,01$ für 1:20) eine signifikante höhere Stimulation durch die transfizierten DCs. Dieses Ergebnis wurde in den autologen System bestätigt ($p=0,025$ für 1:10 bzw $0,049$ für 1:50). Somit kann den, mit Tumor-Poly-RNA transfizierten dendritischen Zellen, ein deutlich höheres Stimulationspotential auf Lymphozyten zugeschrieben werden, als den nativen dendritischen Zellen.

Tumorspezifische T-Zellen konnte in allen durchgeführten Chromfreisetzungssassays nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Zytotoxizität der T-Zellen im Hinblick auf die stimulierenden Zellen: Sowohl mit transfizierten DCs stimulierte als auch mit nativen DCs stimulierte T-Zellen zeigen die gleiche Lysekapazität. Die bereits bestehende Tumorspezifität wurde mit einer Blastenlinie nachgewiesen.

Schlussfolgerung: Mit autologer Tumor-RNA transfizierte DCs sind potente Stimulatoren für T-Zellen. Es ist anzunehmen, daß eine Tumorspezifität durch die Transfektion vermittelt werden kann. In den von uns durchgeführten Versuchen im autologen System, bestand zum Zeitpunkt der Versuche schon eine Tumorspezifität, die mit einer Blastenlinie nachgewiesen werden konnte.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Barbara Wollenberg für die Überlassung des Themas, für ihr stetes Interesse, die freundschaftliche Betreuung und manchen wertvollen Hinweis bei der Abfassung der Arbeit.

A very big thank goes to MD Marie Roskrow who gave me the opportunity to finish this thesis in her group and laboratory. Working with and in her group I have experienced not only parts of the colourful and fascinating world of immunology but a highly reliable team gathered round a brilliant mind.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Sybille Regn, die mich mit viel Geduld in die verwendeten Techniken einarbeitete. Die langen Abende und Nächte in denen wir Ansätze planten und Ergebnisse diskutierten waren eine unbezahlbare Bereicherung.

Frau Silke Raffegerst und Herr Mario Peluso unterstützen die Arbeit mit ihrem reichen Erfahrungsschatz und der steten Bereitschaft zur Hilfestellung.

Einen besonderen Dank möchte ich an alle Patienten der der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten des Klinikums Großhadern richten, die bereit waren durch ihre Blutspenden diese Arbeit zu ermöglichen. Hervorzuheben ist Herr Gerhardinger, ohne dessen großen persönlichen Einsatz viele Fragen unbeantwortet geblieben wären.

LITERATURVERZEICHNIS

Albert M.L., Pearce S.F., Francisco L.M., Sauter B., Roy P., Silverstein R.L., Bhardwaj N. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **188**, 1359-1368, 1998

Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* **1**, 1327-1335. 1995

Anichini A, Molla A, Mortarini R, Tragni G, Bersani I, Di Nicola M, Gianni A, Oilotti S, Dunbar R, Cerundolo V, Parmiani G. An Expanded Peripheral T Cell Population to a Cytotoxic T Lymphocyte defined, Melanocyte-specific Antigen in Metastatic Melanoma Patients Impacts on Generation of Peptide-specific CTLs but Does not Overcome Tumor Escape from Immune Surveillance in Metastatic Lesions. *J.Exp.Med Num.5*, 651-667, 1999

Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. (2000) Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* **15**, 95(8), 2484- 2490, 2000

Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. (2000) Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* **15**, 95(8), 2484- 2490, 2000

Ashley D.M., Fiola B., Nair S., Hale L.P., Bigner D.D., Gilboa E. Bone-marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce anti-tumor immunity against central nervous system tumors. *J. Exp. Med.* **186**, 1177-1182 2000

Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J, Palucka K. (2000) Immunobiology of Dendritic cells. *Annu.Rev.***18**, 767-811, 2000

Baskar S, Nabavi N, Glimcher LH, Rosenberg S. Tumor cells expressing major histocompatibility complex class II and B7 activation molecules stimulate potent tumor specific immunity. *J Immunother* 1993; 14:209-214.

Bell D., Banchereau J. Dendritic cells. *Adv Immunol.*, **72**, 255-324. 1999

Berlinger N.; Tsakraklides V. and Polak K. (1976). Prognostic significance of lymph node histology in patients with squamous cell carcinoma of the larynx, pharynx and oral cavity. *Laryngoscope* **86**: 792-803. 1976

Boczkowski D, Nair SK, Synder D. Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med.* **184**, 465-472, 1996

Boussiotis V.A., Freeman G.J., Berezovskaya A., Barber D.L., Nadler L.M. Maintenance of human T cell anergy, blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* **278**, 124-128, 1997

Bronstein-Sitton N, Wang L, Cohen L, Baniyash M. Expression of the T cell antigen receptor zeta chain following activation is controlled at distinct checkpoints. Implications for cell surface receptor down-modulation and re-expression. *J Biol Chem* 1999; 274(33):23659-23665.

Brossart, P., Goldrath, A.W., Butz, E.A., Martin, S., Bevan, M.J. Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL. *J. Immunol.* **158**, 3270-3278, 1997

Buer J., Lanoue A., Franzke A., Garcia C., von Boehmer H., Sarukhan A. (1998) Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. *J.Exp.Med*, **187**, 177-183, 1998

Cardi G, Heaney, J.A., Schned, A.R., Phillips, D.M., Branda, M.T., and Ernstoff, M.S.

T-cell receptor α -chain expression on tumorinfiltration lymphocytes from renal cell carcinoma. *Cancer Res* , 1997; 57:3517-3519.

Cardi-G; Heaney-JA; Schned-AR; Phillips-DM; Branda-MT; Ernstoff-MS (1997) T-cell receptor zeta-chain expression on tumor infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *Cancer Research*; **57/16** (3517-3519) 1997

Catimel G. (1996). Head and neck cancer. *Drugs* **51** (1): 73-88. 1996

Cella, M., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinions in Immunology* **9**, 10-16, 1997

Chaubal S., Wollenberg B., Kastenbauer E. and Zeidler R. (1998). Ep-CAM – a marker for the detection of disseminated tumor cells in patients suffering from HNSCC. *Anticancer Res* **24**: 2344-2356. 1998

D'Souza S, Rimoldi D, Lienard D, Lejeune F, Cerottini J, Romero P. Circulation Mean-A/Mart-1 specific cytolytic T Lymphocyte precursors in HLA-A2+ Melanoma Patients have a Memory Phenotype. *Int. J. Cancer* **78** 699-706, 1998

Dooche I. and Albers F. (1994). Multiple primary tumors in head and neck cancer: etiology and incidence. *J Belge Radiol* **77** (2): 55-59. 1994

Dworacki G, Meidenbauer N, Kuss I, Hoffmann TK, Gooding W, Lotze M, Whiteside TL. Decreased zeta chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma. *Clin Cancer Res Mar;7(3 Suppl)*:947s-957s 2001

Ervin T., Clark J. and Weichselbaum R. (1987). An analysis of induction and adjuvant chemotherapy in the multidisciplinary treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* **5**: 10-20. 1987

Fearnley D.B., McLellan A.D., Mannering S.I., Hock B.D., Hart D.N. (1997) Isolation of human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal antibody: implications for studies on antigen-presenting cell function and immunotherapy. *Blood* **15**,89 (10), 3708-16. 1997

Field J., Spandidos D., Malliri A., Gosney J., Yiagnisis M. and Stell P. (1991). Elevated p53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* **64**: 573-577. 1991

Galibert L., Maliszewski C.R., Vandenabeele. (2001) Plasmacytoid monocytes/Tcells, a dendritic cell lineage? *Seminars in Immunology* **13**, 283-289, 2001

Gallucci S., Lolkema M., Matzinger P. Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells *Nat.Med.* 5 11 1249 – 1255, 1999

Gastman BR, Johnson DE, Whiteside TL, Rabinowich H. Caspase-mediated degradation of T-cell receptor zeta-chain. *Cancer Res* 1999; 59(7):1422-1427.

Gilboa E. The makings of a Tumor Rejection Antigen, Review. *Immunity, Vol 11*. 263-270, september 1999

Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Experimental Hematology* 29 (2001) 1247-1255

Hodder S., Edwards M., Brickley M. and Shepherd J. (1997). Multiattribute utility assessment of outcomes of treatment for head and neck cancer. *Br J Cancer* **75** (6): 898-902. 1997

Houck J. and Medina J. (1995). Management of cervical lymph nodes in squamous carcinomas of the head and neck. *Seminars Surg Oncol* **11**: 228-239. 1995

Hsu F.J., Benike C., Fangoni F., Liles T.M., Czerwinski D., Taidi B., Engleman

E.G., Levy R. Vaccination of Patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat.Med.* **2**, 52-58, 1996

Johansson B, Palmer E, Bolliger L. The extracellular domain of the zeta-chain is essential for TCR function. *J Immunol* 1999; 162:878-885.

Kuss-I; Saito-T; Johnson-JT; Whiteside-TL. (1999) Clinical significance of decreased zeta chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer. *Clinical cancer Research*; **5/2** (329-334) 1999

Leemans C., Tiwari R. et al.(1993). Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* **73**: 187-190. 1993

Marincola M.M., Jaffee E.M., Hicklin D.J., Ferrone S. (2000) Escape of Human solid Tumors from T-Cell Recognition: Molecular Mechanisms and Functional Significance. *Advances in Immunology Vol. 74*, 2000

Mathiassen S, Lauemöller S, Ruhwald M, Claesson M, Buus S. Tumor-associated antigens identified by mRNA expression profiling induce protective anti-tumor immunity. *Eur. J. Immunol.* 2001, **31**: 1239-1246

Matzinger P An innate sense of danger.
Ann N Y Acad Sci 2002 Jun;961:341-2

Mittrucker HW, Steeg C, Malissen B, Fleischer B. The cytoplasmic tail of the T cell receptor zeta chain is required for signaling via CD26. *Eur J Immunol* 1995; **25**(1):295-297.

Murphy G., Tjoa B., Ragde H., Kenny G., Boynton A. Phase I clinical trial, Tcell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* **29**, 371-380, 1996

Nair S.K., Boczkowski D., Morse M., Cumming R.I., Lysterly H.K., Gilboa E. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat. Biotechnol* **16**,364-369, 1998.

Nestle F.O., Alijagic S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G., Schadendorf D. (1998), Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate- pulsed DC. *Natur Medicine* **4**, 3, 328-332 March 1998

Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Fay Joseph, Palucka K. Dendritic cell based tumor vaccines. *Immunology Letters* 74 (2000) 5-10

Ochsenbein A, Klenerman P, Karrer U, Ludewig B, Pericin M, Hengartner H, Zinkernagel R.M. Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA Vol. 96*, pp. 2233-2238, March 1999.

Parker S., Tong T. et al. (1996). Cancer statistics. *C. A. Cancer J Clin* **46**:5-27. 1996

Rabinowich H, Suminami Y, Reichert TE et al. Expression of cytokine genes or proteins and signaling molecules in lymphocytes associated with human ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 1996; 68(3):276-284.

Reichert TE, Day R, Wagner EM, Whiteside TL. Absent or low expression of the zeta chain in T cells at the tumor site correlates with poor survival in patients with oral carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58(23):5344-5347.

Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer* 2001; 91(11):2136-2147.

Renkvist N, Castelli C, Robbins P, Parmiani G. A Listing of human tumor Antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* (2001) 50: 3-15

Sikora J, Dworacki G, Zeromski J. Expression of TCR zeta chain of tumor associated lymphocytes from malignant pleural effusions. *Adv Exp Med Biol* 2001; 495:325-329.

Song, W., Kong, H., Carpenter, H., Torii, H., Granstein, R., Rafii, S., Moore, M. A. S. & Crystal, R. G. Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model tumor antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *J. Exp. Med.* **186**, 1247-1256, 1997

Su Z, Peluso MV, Raffegerst SH, Schendel DJ, Roskrow MA. The generation of LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with EBV positive Hodgkin disease. *Eur. J. Immunol.* **31** (3), 947-958, 2001

Tan E., Adelstein D., Droughton M., Van Kirk M. and Lavertu P. (1997). Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers. *Am J Clin Oncol* **20** (2): 146-150. 1997

Tjoa B., Simmons S.J., Bowes V.A., Ragde H., Rogers M., Elgamal A., Kenny G., Cobb O.E. Ireton R.C., Troychak M.J., Salgaller M.L., Boynton A., Murphy G. Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate*, **36**, 39-44, 1998

van Dongen G., Brakenhoff R., Brink C., van Gog F., de Bree R., Quak J. and Snow G. (1996). Squamous cell carcinoma-associated antigens used in novel strategies for the detection and treatment of minimal residual head and neck cancer. *Anticancer Res* **16**: 2409-2414.

Vokes E., Weichselbaum R., Lippman S. and Hong W. (1993). Head and neck cancer. *N Engl J Med* **328**: 184-191.

Wang Q, Stanley J, Kudoh S et al. T cells infiltrating non-Hodgkin's B cell lymphomas show altered tyrosine phosphorylation pattern even though T cell receptor/CD3- associated kinases are present. *J Immunol* 1995; 155(3):1382-1392.

Whiteside TL (2001). Immunobiology and immunotherapy of head and neck cancer. *Curr Oncol Rep Jan*; **3**(1):46-55

Wojtowicz-Praga, S. (1997) Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J. Immunother.* 20, 165-177. 1997

Wollenberg B., Ollesch A., Maag K., Funke I und Wilmes E. (1994). Mikrometastasen im Knochenmark von Patienten mit Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. *Laryngo-Rhino-Otologie* 73: 88.

Zbaren P. and Lehmann W. (1987). Frequency and sites of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **113**: 762-764.

Zea, A.H., Curti, B. D., Longo, D.L., Alvord, W.G., Strobel, S.L., Mizoguchi, H., Creekmore, S.P., O'Shea, J.J., Powers, G.C., Urba, W.J., and Ochoa, A.C. (1995) Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* **1**, 1327-1335. 1995

Zitvogel L., Mayordomo J.I, Tjandrawan T., Deleo A.B., Clarke M.R., Lotze M.T. Storkus W.J. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells, dependence on T cells, B7 costimulation and T helper cell 1- associated cytokines. *J. Exp. Med.* **183**, 87-97, 1996

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1. Schematische Darstellung der Funktion, der T-Zell spezifischen Immunantwort. Die Antigenpräsentierende Zelle präsentiert über MHC ein tumorspezifisches Peptid. Dieses wird vom T-Zellrezeptor erkannt. Durch das Vorhandensein der kostimulatorischen Moleküle reift die T-Zelle zu einer zytotoxischen T-Zelle heran. Beim zweiten Kontakt mit dem tumorspezifischen Antigen erfolgt eine zytotoxische Reaktion, und die Tumorzelle wird zerstört. Intrazellulär in der T-Zelle liegt die ζ -Kette (hier Zeta), die die Aufgabe der Signaltransduktion erfüllt. 14
- Abbildung 2. Schematische Darstellung der Differenzierung verschiedener Subpopulationen von dendritischen Zellen, aus einer CD34⁺ Vorläuferzelle, in Abhängigkeit des umgebenden Zytokin-Mikro-Milieus (nach Banchereau *et al.* 2000). 16
- Abbildung 3. MHC-Klasse I-Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten, eine α - oder schwere Kette, die im MHC-kodiert wird und eine kleinere, nicht kovalent angelagerte Kette, (β_2 -Mikroglobulin (β_2 -M)), die nicht im MHC kodiert wird. Nur die α -Kette ist fest in der Zellmembran verankert und besteht aus drei Domänen. Die Struktur der α_1 und α_2 Domänen bilden ein Paar und schaffen an der Oberfläche des Moleküls den Peptidbindenden Spalt. MHC-Klasse II- Moleküle bestehen aus einem nichtkovalenten Komplex zweier α und β -Ketten, die beide die Membran durchdringen. Beide Ketten haben jeweils zwei Domänen, die gemeinsam den peptidbindenden Spalt bilden (nach Janeway 1997, verändert) 19
- Abbildung 4. Stark vereinfachte Darstellung der Immune Escape Mechanismen des Tumors gegen den Angriff der T-Zelle. Die Tumorzelle entzieht sich dem Angriff der T-Zelle in dem keine oder nur wenige, für die T-Zellantwort wichtigen Adhäsionsmoleküle, exprimiert werden. Außerdem kommt es zu einer Herunterregulierung der MHC-Klasse I Moleküle, die wichtig sind für die Erkennung der T-Zelle über den T-Zellrezeptor. Zusätzlich werden von der Tumorzelle inhibitorische Zytokine freigesetzt, die immunologische Toleranz oder Ignoranz induzieren können. 22

Abbildung 5. Schematische Anordnung einer 96-Well-Spitzbodenplatte wie sie für die Chromfreisetzungsexperimente verwendet wurde.	43
Abbildung 6. Zunehmend verminderte Expression der ζ -Kette auf PBMCs bei zunehmender TumorgroÙe (rechte ABB). Im Vergleich zur gleichbleibenden Expression des gesamten TCR gemessen an der Expression von CD3 (linke ABB) lässt sich mit der Verminderung der ζ -Kette ein isolierter Rezeptordefekt nachweisen, der mit der Progression der TumorgroÙe korreliert.	48
Abbildung 7. Expression der ζ -Kette auf PBMCs in Abhängigkeit des UICC-Stadium.....	49
Abbildung 8. Verlust der ζ -Kette in PBMCs (linker Dotplot) ist deutlich geringer als in den TILs (rechter Dotplot) ein und des selben Patienten.....	50
Abbildung 9. Vergleich der ζ -Kettenexpression in PBMCs (linke Säule) versus TILs (rechte Säule) Der enorme Verlust der ζ -Kette bei Patient 35 kann nur mit Hilfe einer eigenen Skala dargestellt werden.	50
Abbildung 10. Die Expression der ζ -Kette bei primärer Diagnose des SCCHN in Korrelation zum klinischen Verlauf. Die bereits initial verminderte Expression der ζ -Kette ist signifikant mit der Entwicklung eines lokoregionären Rezidivs korreliert.....	51
Abbildung 11. Unreife DCs in einer Kulturplatte: Die Zellen aggregieren und bilden sich zu kleineren und größeren Clustern zusammen.....	52
Abbildung 12. zeigt den Vergleich zwischen unreifen und reifen dendritischen Zellen anhand eines charakteristischen Beispiels.	53
Abbildung 13. Prozentuale Verteilung der Oberflächenmarker auf reifen und unreifen DCs. Die Werte zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von acht repräsentativen Experimenten. Die hellen Balken repräsentieren DCs, die in serumfreien Medium für 10-12 Tage in der Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF kultiviert wurden. Die dunkelgrauen Balken zeigen die gleichen Zellen, die aber drei Tage länger unter Zusatz von TNF- α zur Reife stimuliert wurden.	54
Abbildung 14. Aufnahme durch FITC-Dextran durch unreife DCs (dicke Linie)	

im Vergleich zu reifen DCs (dünne Linie)	56
Abbildung 15. Ergebnis der allogenen MLR. Die Balkenfarbe gibt das Verhältnis von Stimulatoren zu T-Zellen an. Schwarz steht für 1 zu 10, grau für 1 zu 20 und weiß für 1 zu 50.	58
Abbildung 16. Ergebnis der autologen MLR. Die Balkenfarbe gibt das Verhältnis von Stimulatoren zu T-Zellen an. Schwarz steht für 1 zu 10, grau für 1 zu 20 und weiß für 1 zu 50.	61
Abbildung 17. Schematische Darstellung des standart Chromfreisetzungs Test. In A, ist das Markieren, bei dem die Zielzellen mit ⁵¹ Chrom- haltigem Medium inkubiert werden, dargestellt. Nach drei Waschschritten befindet sich das ⁵¹ Chrom nur noch in den somit markierten Zielzellen. Diese werden anschließend (>B,) mit den Effektorzellen inkubiert. Findet eine Lyse statt, so kann das freigesetzte ⁵¹ Chrom im zellfreien Überstand in einem Gammacounter gemessen werden	63
Abbildung 18. Lyseaktivität von T-Zellen die in einer Kokultur mit transfizierten dendritischen Zellen gehalten wurden, gegen verschiedene Targets: Tumor entspricht dem autologen Tumor des Patienten, Auto-LCL ist die autologe B-Zellline des Patienten, Allo-DC allogene dendritische Zellen eines Spenders, Allo-LCL eine allogene B-Zellline und HSB-2 als eine NK-Zellen sensitive Zellline. Ratio gibt an, wieviele Effektoren (40, 20, 10 oder 5) auf eine Targetzelle kommt.	66
Abbildung 19. Lyseaktivität von T-Zellen die in einer Kokultur mit nicht transfizierten dendritischen Zellen gehalten wurden, gegen verschiedene Targets: Tumor entspricht dem autologen Tumor des Patienten, Auto-LCL ist die autologe B-Zellline des Patienten, Allo-DC allogene dendritische Zellen eines Spenders, Allo-LCL eine allogene B-Zellline und HSB-2 als eine NK-Zellen sensitive Zellline	66
Abbildung 20. Lyseaktivität von T-Zellen die in einer Kokultur mit transfizierten dendritischen Zellen gehalten wurden, gegen verschiedenen Targets: Tumor entspricht dem autologen Tumor des Patienten, P-match-DC steht für die DCs der Tochter des Patienten und Auto-LCL ist die autologe B-Zellline des Patienten. Ratio bedeutet die	

Anzahl der Effektoren (40, 20, 10 oder 5) pro Targetzelle.....	68
Abbildung 21. Lyseaktivität von CTL die in einer Kokultur mit nicht transfizierten dendritischen Zellen gehalten wurden, gegen verschiedenen Targets: Tumor entspricht dem autologen Tumor des Patienten, P-match- DC steht für die partiell gematchten DCs der Tochter des Patienten und Auto-LCL ist die autologe B-Zelllinie des Patienten.	68
Abbildung 22. Lyseaktivität von Blasten die aus den Lymphozyten des Patienten gewonnen wurden, gegen verschiedenen Targets: Tumor entspricht dem autologen Tumor des Patienten, P-match-DC steht für die partiell gematchten DCs der Tochter des Patienten und Auto-LCL ist die autologe B-Zelllinie des Patienten.	69

LEBENS LAUF

Name	Daniel Müller
Geburtsdatum	21.10.1970
Geburtsort	Gräfelfing bei München
Wohnort	Connollystraße 7, K-04, 80809 München
Schul Ausbildung:	
<i>Grundschule:</i>	1977- 1981 Volksschule Feldkirchen-Westerham
<i>Gymnasium:</i>	1981- 1988 Gymnasium Bad Aibling 1988- 1991 LHS Marquartstein
Zivildienst:	1993- 1995 Klinikum Großhadern, HNO-Station I-8
Berufsausbildung:	1991- 1993 Ausbildung zum Steinbildhauer in der Lehrwerkstat des Bildhauers Joachim M. Hoppe in Thaining / Ammersee
Hochschulausbildung:	
1993 – 1995	Vorklinischer Studienabschnitt an der Semmelweis Universität Budapest
1995 - 1997	Erster klinischer Studienabschnitt an der Universität- Gesamthochschule Essen
1997 - 2001	Zweiter klinischer Studienabschnitt an der TU-München
Examina:	
Juli 1995	Ärztliche Vorprüfung
Aug. 1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Praktisches Jahr:	
	<ul style="list-style-type: none">• Chirurgie am Royal Cornwall Hospital in Truro / UK mit Schwerpunkt Unfallchirurgie und Thoraxchirurgie• Innere Medizin, erste Hälfte am Royal Cornwall Hospital in Truro / UK, Schwerpunkt Cardiologische Intensivstation• Innere Medizin, zweite Hälfte im Deutschen Herzzentrum auf der Intensivstation unter Herrn Prof. Blasini• Pädiatrie in der Kinderklinik des Krankenhaus Schwabing unter Herrn PD. Dr. Peters.
Arzt im Praktikum:	Von Juni 2002 bis Dezember 2003 AiP in der Kinderklinik der Technischen Universität München.
Assistenzarzt:	Seit dem 1. Januar Assistenzarzt in der Kinderklinik der Technischen Universität München.